



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas

**Desarrollo de un *kit ELISA* tipo *sandwich*, para la
detección de antígenos de excreción-secreción de
Fasciola hepatica linnaeus, 1758**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Zoología

AUTOR

Rinaldo Josué ECHEVARRIA DEL VALLE

ASESOR

Erasmus Honorio COLONA VALLEJOS

Lima, Perú

2013



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Echevarria, R. (2013). *Desarrollo de un kit ELISA tipo sandwich, para la detección de antígenos de excreción-secreción de Fasciola hepatica linnaeus, 1758*. Tesis para optar el título de Biólogo con mención en Zoología. Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres: Don Oscar Adrian Echevarría Blanco y Doña Haydee Yolanda
Del Valle Poma.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no se hubiera podido realizar sin el apoyo y asesoría de la Dra. Libertad Alzamora Gonzales y el Blgo. Erasmo Honorio Colona Vallejos. Al Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM; al Departamento de Protozoología, Helmintología e Invertebrados Afines del Museo de Historia Natural “Javier Prado” de la UNMSM a cargo de la Blga. Lidia Sánchez. Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), ya que con los fondos del Proyecto PROCYT 2006, se pudieron comprar insumos, que fueron empleados en el desarrollo del presente estudio. A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología: Carolina de Amat, Miguel Aguilar, Ana Mayanga, Alejandra Jiménez, Joel Elías, Carlos Calderón, Diego Macedo y Ronald Aquino; y a mi compañero del Departamento de Protozoología, Helmintología e Invertebrados Afines: Luis Ñacari.

ÍNDICE

i) RESUMEN

ii) *ABSTRACT*

iii) ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	25
V. RESULTADOS	33
VI. DISCUSIÓN	48
VII. CONCLUSIONES	54
VIII. RECOMENDACIONES	55
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
X. ANEXOS	74

RESUMEN

La fasciolosis, producida por *Fasciola hepatica*, es una parasitosis cosmopolita de importancia médico-veterinaria que afecta a la ganadería lechera con prevalencias superiores al 80% que generan significativas pérdidas económicas. Por lo tanto, es importante contar con técnicas de diagnóstico que permitan la identificación temprana del parásito como las técnicas de captura cuando el antígeno se encuentra en baja concentración en la muestra. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un *kit* de *ELISA* para detectar antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.

Se desarrolló un *kit* de *ELISA* tipo *sandwich* para la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, el cual alcanzó un límite de detección de 100 ng/mL, empleando una concentración óptima de anticuerpo de captura (anticuerpos policlonales de ratón) y segundo anticuerpo (anticuerpos policlonales de conejo) de 10 y 5 µg/mL, respectivamente; y una dilución óptima del conjugado (anticuerpo monoclonal anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con la enzima peroxidasa) de 1/1000. El *kit* de *ELISA* tipo *sandwich*, presentó un valor de sensibilidad del 100%, una especificidad del 96.6% y valores predictivos positivos y negativos de 50% y 96.6% respectivamente; con relación al examen coproparasitológico directo. Al comparar el *ELISA* tipo *sandwich* con la contrainmunolectroforesis (CIEF) se obtuvo una especificidad de 93.5% y un valor predictivo negativo del 100%.

El *kit* de *ELISA* tipo *sandwich* desarrollado permite detectar antígenos metabólicos en muestras de heces de ganado ovino.

Palabras claves: Inmunodiagnóstico; *ELISA sandwich*; antígenos de excreción-secreción; anticuerpos policlonales de ratón y conejo; *Fasciola hepatica*.

ABSTRACT

The fascioliasis, caused by *Fasciola hepatica*, is a parasitism cosmopolitan veterinary-medical importance affecting dairy farming with prevalences greater than 80% that generate significant economic losses. Therefore, it is important to have diagnostic techniques that allow early identification of the parasite as capture techniques when the antigen is found in low concentration in the sample. The aim of this work was to develop an ELISA kit for detection of excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*.

Develop a sandwich ELISA kit for detection of excretion-secretion antigens from *Fasciola hepatica*, which reached a detection limit of 100 ng / mL, using an optimal concentration of capture antibody (mouse polyclonal antibodies) and second antibody (rabbit polyclonal antibodies) of 10 and 5 mg / mL, respectively, and an optimal dilution of conjugate (monoclonal anti-rabbit immunoglobulin conjugated with enzyme peroxidase) 1 / 1,000. The kit sandwich ELISA, presents a sensitivity value of 100%, a specificity of 96.6% and positive and negative predictive values of 50% and 96.6%, respectively, in relation to direct coproparasitologic. Comparing the sandwich ELISA with the counterimmunoelectrophoresis (CIEP) obtains a specificity of 93.5% and a negative predictive value of 100%.

The sandwich ELISA kit was developed to detect metabolic antigens in stool samples of sheep.

Keywords: Immunodiagnosis; sandwich ELISA; excretory-secretory antigens, polyclonal mouse and rabbit; *Fasciola hepatica*.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AgESFh: Antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.

ARN: Ácido ribonucleico.

CIEF: Contrainmunolectroforesis.

COPRO: Análisis coproparasitológico directo.

D.O.: Densidad óptica.

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima.

ICF: Inmunoensayo en capa fina.

IEF: Inmunolectroforesis.

IgA: Inmunoglobulina de isotipo o clase A.

IgE: Inmunoglobulina de isotipo o clase E.

IgG: Inmunoglobulina de isotipo o clase G.

IL: Interleuquina.

PBS: Tampón fosfato salino.

SAB: Seroalbúmina bovina.

TIA: *Thin layer immunoassay*, Inmunoensayo en capa fina.

I. INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una parasitosis cosmopolita de importancia médico-veterinaria ocasionada por *Fasciola hepatica*, que se localiza en los conductos biliares de ganado ovino, caprino y vacuno; y accidentalmente en el hombre, al que provoca una infección endemoepidémica de difícil diagnóstico (Mas-Coma *et al.*, 1999; Colona *et al.*, 2001). En el ganado ovino, caprino y vacuno, los síntomas clínicos de la fasciolosis son heterogéneos y asociados a la cantidad de metacercarias ingeridas por el animal (Dalton, 1999; Ordóñez, 2010). No obstante, el ganado vacuno desarrolla cierta resistencia a la infección con *Fasciola hepatica* (Piedrafita *et al.*, 2001). Por lo que la heterogénea sintomatología clínica ocasionada por la fasciolosis en el ganado, no es de ayuda para reportar la enfermedad en una etapa inicial, ni para diferenciarla de otras parasitosis.

La vacunación es una alternativa para proteger al ganado de una futura infección con *Fasciola hepatica*; pero a pesar de las numerosas investigaciones que se han realizado con este objetivo, aún no se cuenta con una vacuna (Wijffels *et al.*, 1994). Por la cual el diagnóstico temprano y certero, permite realizar un tratamiento eficaz con algún fármaco antihelmíntico (Rokni *et al.*, 2004) y monitorear el correcto curso del tratamiento, indicando en cada momento el estado de la infección en el animal parasitado (Duménigo *et al.*, 1998; Noureldin *et al.*, 2004). La determinación clásica de la fasciolosis es por medio del examen coproparasitológico, este diagnóstico no podría realizarse durante la fase aguda o período prepatente de la enfermedad, debido a que el parásito se encuentra migrando en el parénquima hepático sin llegar a la madurez sexual; además iniciada la oviposición aún es difícil el diagnóstico, puesto que la excreción de huevos es intermitente y en muchos casos no pueden ser determinados mediante el examen coproparasitológico simple, por lo que es necesario el empleo de técnicas coproparasitológicas de concentración o la realización de varios exámenes seriados (Maleewong *et al.*, 1999).

Como alternativa para el diagnóstico de la fasciolosis se han desarrollado métodos inmunoserológicos, basados en la detección de anticuerpos los cuales son más rápidos y factibles. La desventaja en la detección de anticuerpos es no poder diferenciar una infección pasada de una reciente (Espino *et al.*, 1998; Maleewong *et al.*, 1999; Espinoza *et al.*, 2010) y el elevado número de reacciones cruzadas que se presentan con otras entidades parasitarias (Cornelissen *et al.*, 1999; Carnevale *et al.*, 2001). En los últimos años se han desarrollado inmunoensayos, basados en la detección de antígenos, que son capaces de detectar la infección activa y en la etapa prepatente (Estuningsih *et al.*, 2009).

En el Perú se han utilizado los métodos serológicos *Fas2-ELISA*, *Western blot* y Arco 2, para la detección de anticuerpos específicos en suero de personas con fasciolosis (Maco *et al.*, 2002; Marcos *et al.*, 2007; Espinoza *et al.*, 2010; Escalante *et al.*, 2011); de los cuales el método *Fas2-ELISA* ha sido utilizado para el diagnóstico de fasciolosis en el ganado bovino (Valencia *et al.*, 2005).

Los exámenes coproparasitológicos y la prueba serológica *Fas2-ELISA*, han permitido conocer que existen tasas altas de infección con *Fasciola hepatica* en los pobladores y el ganado ovino y bovino residentes en las diferentes localidades rurales de nuestro país (Maco *et al.*, 2002; Valencia *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2007; Espinoza *et al.*, 2010), pero se ha comprobado que estas metodologías sólo pueden diagnosticar la fasciolosis en la fase crónica; por lo cual no son de utilidad para empezar y monitorear un tratamiento eficaz con drogas antihelmínticas (Sánchez-Andrade *et al.*, 2001; Espinoza *et al.*, 2010; Ticona *et al.*, 2010). Esto hace necesario disponer de un método de diagnóstico rápido, inequívoco y capaz de detectar la fasciolosis en su etapa prepatente; que permita un tratamiento oportuno, prevenir la diseminación y conocer la realidad epidemiológica en las distintas regiones del país, y a futuro elaborar estrategias descentralizadas sobre la prevención y control de la fasciolosis en la población rural.

En la actualidad el *ELISA* tipo *sandwich*, está siendo ampliamente utilizado, para el diagnóstico temprano y veraz de la fasciolosis; por ser capaz de capturar antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, presentes en suero o heces (coproantígenos) de animales infectados (Espino & Finlay, 1994; Duménigo *et al.*, 1998; Sánchez-Andrade *et al.*, 2000; Almazán *et al.*, 2001; Estuningsih *et al.*, 2009; Rabia *et al.*, 2010). En nuestro país ha sido evaluado en ganado ovino, bovino y alpacas, el *kit* FASCIDIG® elaborado en el Instituto Pedro Kourí de Cuba, el cual es una propuesta de *ELISA* tipo *sandwich*. Los resultados obtenidos son alentadores y sustentan la necesidad de implementar o diseñar *kits* de *ELISA* tipo *sandwich* para la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* en nuestro país (Torrel, 1997; Colona *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005).

En tal sentido, el presente trabajo tiene el objetivo de desarrollar un *kit* de *ELISA* tipo *sandwich* para detectar antígenos de excreción-secreción, con la finalidad de subsanar las limitaciones económicas y de diagnóstico inherentes a las pruebas coproparasitológicas e inmunoserológicas y, contribuir a la detección temprana de la fasciolosis en el Perú. El uso de proteínas nativas del parásito para la evaluación del presente *kit* consolidara la propuesta de desarrollo de un *ELISA* tipo *sandwich*.

II. MARCO TEÓRICO

1. GENERALIDADES

La fasciolosis es una infección parasitaria causada por tremátodos del género *Fasciola*, y la especie más frecuente a nivel mundial es *Fasciola hepatica*, la cual se encuentra distribuida en todos los continentes e infecta a gran cantidad de mamíferos, principalmente al ganado ovino, bovino, caprino y al hombre. Otra especie de este género es *Fasciola gigantica*, distribuida preferentemente en el Sudeste asiático, África e Islas Hawai (Mas-Coma *et al.*, 1999; Mas-Coma, 2005; Marcos *et al.*, 2007). Este tremátodo requiere, para completar su ciclo de vida, de un hospedero intermediario, representado por un molusco que pertenece a la familia *Lymnaeidae* (Dalton, 1999).

El parásito adulto de *F. hepatica* presenta forma aplanada, con apariencia carnosa y extremo anterior saliente en forma de cono, con una ventosa oral y otra ventral. Mide aproximadamente de 2 a 3 cm de largo y 1 cm de ancho. Son parásitos hermafroditas y ambas gónadas se encuentran bien desarrolladas con forma ramificada. El aparato digestivo se encuentra formado por la faringe, el esófago y el ciego, este último dividido en dos tubos ramificados. Este tremátodo habita en los conductos hepáticos o biliares de sus hospederos definitivos, en los que pone huevos ovalados de gran tamaño, que oscilan entre los 130-150 × 60-90 µm y presentan un opérculo en uno de sus extremos (Travassos *et al.*, 1969; Dalton, 1999).

1.1. Ciclo de vida

Los huevos salen al intestino con la bilis y son eliminados con la materia fecal al medio. Es indispensable que los huevos caigan al agua dulce donde el embrión da origen a la primera forma larvaria que se denomina miracidio. El miracidio ciliado nada libremente en el agua e invade un molusco de la familia *Lymnaeidae* (Dalton, 1999). En el Perú se conocen dos especies de moluscos que se comportan como hospederos intermediarios de este parásito: *Lymnaea columella* y *Lymnaea viatrix* (Larrea *et al.*,

2007); la infección natural para ambos limneidos se corroboró mediante la infección experimental en condiciones adecuadas con miracidios obtenidos *in vitro*, se reporta que *Lymnaea viatrix*, presenta una susceptibilidad alta a la infección y una menor tasa de mortalidad en comparación con *Lymnaea columella* (Hurtado, Huiza & Tantaleán, 1994; Tantaleán *et al.*, 2000; Larrea *et al.*, 2007) . En el interior del caracol el parásito se reproduce y desarrolla las formas larvianas de esporoquistes, redias y cercarias; estas últimas tienen cuerpo redondeado y cola no bifurcada. Las cercarias abandonan el caracol y nadan en el agua para buscar plantas a las cuales se adhieren y se transforman en metacercarias de aproximadamente 0.5 mm. Los hospederos definitivos se infectan al ingerir plantas contaminadas con metacercarias o por la ingesta de agua con metacercarias flotantes que han sido extraídas de lugares donde existen caracoles infectados. En el intestino delgado del hospedero se libera el parásito inmaduro, que atraviesa la pared intestinal, el peritoneo y la cápsula hepática, para luego buscar los canales biliares en donde se desarrolla a adulto en un periodo de 3 a 4 meses (Dalton, 1999; Mas-Coma *et al.*, 1999). La ingesta de vegetales crudos en ensaladas, preparadas principalmente con el “berro” (*Nasturtium officinale*) o en otras preparaciones culinarias constituye la principal fuente de infección humana (Mas-Coma *et al.*, 1999; Naquira, 2010).

1.2. Patogénesis y manifestaciones clínicas

La patogénesis de la fasciolosis depende esencialmente del número de tremátodos que penetran la pared intestinal e invaden el hígado. En animales, la tasa de mortalidad es inversamente proporcional al número de tremátodos presentes en el hígado. La penetración de las paredes del duodeno y yeyuno, por las metacercarias pueden causar hemorragia e inflamación local, aunque estas lesiones pueden no ser evidentes de forma clínica. Sin embargo los principales efectos perniciosos son causados por la migración del parásito a través del parénquima hepático que puede durar de 4 a 6 semanas o incluso más tiempo. Los parásitos digieren el tejido hepático

causando destrucción masiva del parénquima, con graves lesiones hemorrágicas y reacciones inmunológicas e inflamatorias por parte del hospedador. A veces los parásitos que se encuentran en migración pueden morir, dejando las cavidades llenas de desechos necróticos, que cuando son reparadas son sustituidas por tejido cicatrizado. Los tremátodos inmaduros pueden desviarse durante la migración, invadiendo otros órganos y causando lo que conocemos como fasciolosis ectópica. En el ganado, es frecuente encontrar a *F. hepatica* en los pulmones, mientras que en el ser humano, las lesiones ectópicas más frecuentes ocurren en el tracto gastrointestinal. Los tremátodos cuando alcanzan los conductos biliares pueden permanecer hasta varios años en el hospedero (Dalton, 1999; Ordóñez, 2010).

En la patogenia de esta infección se denotan dos períodos principales: el primero, denominado inicial o de invasión (fase aguda y fase latente), que comienza desde el momento de la ingestión de las metacercarias hasta la implantación de los parásitos en los conductos biliares, y el segundo período, que se conoce como de estado (fase crónica) y es cuando los parásitos alcanzan la madurez sexual y comienzan a eliminar huevos en la materia fecal del hombre o animales infectados (Dalton, 1999; Ordóñez, 2010; Martínez *et al.*, 2012).

Las manifestaciones clínicas que ocasiona la fasciolosis, generalmente son inespecíficas y varían de acuerdo con la fase de la enfermedad. La fase aguda está asociada con la tríada de fiebre, hepatomegalia y eosinofilia. La fase latente se puede comportar de forma asintomática; en ocasiones pueden aparecer escasas manifestaciones gastrointestinales, y la fase crónica asintomática o sintomática inespecífica se caracteriza por cólico biliar, ictericia, colangitis, pancreatitis y fibrosis hepática, ya que los parásitos puede sobrevivir más de una década y causar daño constantemente; en ese contexto, la disfunción del hígado por el daño hepático podría ser irreversible. (Beltrán *et al.*, 2004; Marcos *et al.*, 2007; Espinoza *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012).

1.3. Epidemiología

Esta parasitosis ampliamente distribuida en el mundo, ha adquirido esta condición por poseer una alta capacidad de colonización de su hospedero intermediario y por tener una gran adaptabilidad a la mayoría de las regiones climáticas. Los animales con fasciolosis al no ser tratados adecuadamente, conviven con la infección durante años convirtiéndolos en diseminadores del parásito, por la capacidad de las fasciolas adultas de producir miles de huevos al día. En presencia de un vector competente la fasciolosis puede infectar al ganado vacuno, ovino, equino y camélido; además de caprinos, porcinos y animales menores como conejos, liebres, cobayos; entre otras especies silvestres (Valencia *et al.*, 2005; Espinoza *et al.*, 2010).

La fasciolosis se encuentra emergiendo en todos los continentes y tiene una importancia reconocida, no solo por su repercusión económica, sino por su implicación en la salud humana con una alta morbilidad en determinados territorios. Por tal motivo, la fascioliasis humana no debe considerarse simplemente como una enfermedad zoonótica secundaria, sino como una enfermedad parasitaria humana importante (Mas-Coma *et al.*, 1999; Marcos *et al.*, 2004; Mas-Coma, 2005; Marcos *et al.*, 2007).

Se han reportado prevalencias elevadas para fasciolosis humana y animal en países ubicados en áreas geográficas comprendidas en Sudamérica, Norte de África, República Islámica de Irán y en el Oeste de Europa. En la región de las Américas, la fascioliasis se reporta fundamentalmente en países Sudamericanos como Brasil, Argentina, Venezuela, Bolivia, Perú y en El Caribe, donde han ocurrido brotes esporádicos (Mas-Coma *et al.*, 1999; Marcos *et al.*, 2004; Mas-Coma, 2005; Valencia *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2007; Espinoza *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2012).

Se han identificado múltiples factores climáticos, biológicos, topográficos y humanos que favorecen la perpetuación del ciclo vital de *Fasciola hepatica*. Dentro de

ellos cabe destacar las bajas temperaturas, los climas húmedos, presencia de ganado y pastizales silvestres cercanos a fuentes de agua renovables, así como falta de drenajes. Dentro de los factores humanos se han señalado algunos como el consumo de vegetales crudos de tallo corto y agua no pasteurizada de manantiales, canales o acequias (Valencia *et al.*, 2005; Espinoza *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012).

1.4. Situación en el Perú

En el Perú, la fasciolosis es un importante problema médico-veterinario, considerada clásicamente como una parasitosis esporádica y accidental para el hombre; sin embargo, el incremento de casos humanos durante los últimos años ha determinado que esta parasitosis sea en la actualidad una enfermedad emergente y de importancia en salud pública. Los estudios realizados en varios departamentos del Perú, indican la presencia de zonas hiperendémicas (prevalencias para fasciolosis humana > 10%) en Junín, Puno y Cajamarca. Dentro de los posibles factores de riesgo para la infección por este parásito se menciona el hábito de beber emolientes y vivir cerca de acequias o cultivos. Uno de los factores importantes para la persistencia de esta enfermedad es la infección en animales, especialmente aquellos que están íntimamente ligados a las actividades laborales de la población interandina, como son el ganado vacuno y ovino, que se comportan como reservorios. La información existente en nuestro medio es preocupante debido a las altas cifras de fasciolosis en el ganado. Reportándose en Arequipa una prevalencia de 68.2% en el ganado bovino y 40% en ganado ovino; en Junín una prevalencia en ganado bovino de 75% y en Cajamarca una prevalencia superior al 80% en el ganado bovino (Marcos *et al.*, 2004; Valencia *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2007; Espinoza *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2010).

1.5. Diagnóstico

El diagnóstico está basado en el hallazgo de los huevos del parásito en heces o en el fluido duodenal, pero este presenta serias dificultades, dado fundamentalmente por la eliminación de los huevos de forma intermitente por el parásito (Maleewong *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2012). Esto ha originado que actualmente los sistemas inmunoenzimáticos de determinación de antígenos de excreción-secreción del parásito constituyan una alternativa necesaria e indispensable para lograr este objetivo (Espino & Finlay, 1994; Duménigo *et al.*, 1998; Sánchez-Andrade *et al.*, 2000; Almazán *et al.*, 2001; Estuningsih *et al.*, 2009; Rabia *et al.*, 2010). Los exámenes de laboratorio se realizan por métodos directos, cuando se encuentra el parásito adulto o sus huevos, o indirectos, al detectar anticuerpos u otros signos de sensibilización del hospedero.

Métodos directos

El diagnóstico parasitológico se efectúa por el hallazgo de huevos en la bilis y en las materias fecales, los cuales son negativos en la fase aguda y latente, debido a que el parásito aún no ha llegado a la madurez sexual. El examen de heces debe ser de forma seriada, mediante la realización de diferentes métodos como la coloración con Eosina o Lugol, copa cónica, concentración de Ritchie o Faust y el Kato-Katz. Además el parásito adulto puede observarse macroscópicamente durante el acto quirúrgico de las vías biliares (Espinoza *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012).

Métodos indirectos

Entre los métodos indirectos de diagnóstico, la serología es la herramienta de elección para la detección de anticuerpos específicos. En la actualidad la prueba de *ELISA* (*enzyme-linked immunosorbent assay*) es una de las herramientas diagnósticas más empleadas y aplicable a gran escala, cuya sensibilidad y especificidad depende de la fuente del antígeno utilizado. Otros de los métodos indirectos utilizados son: la prueba de fijación del complemento, inmunodifusión, contrainmunolectroforesis e

inmunofluorescencia para detectar anticuerpos específicos contra *Fasciola hepatica* (O'Neill *et al.*, 1998; Maco *et al.*, 2002; Rokni *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2012).

1.6. Tratamiento

Las drogas empleadas para el tratamiento han sido emetina, dihidroemetina y bithionol, las cuales por su elevada toxicidad y largo período de tratamiento quedaron relegadas por el triclabendazol, el cual es un fasciolicida empleado inicialmente en ganado y posteriormente en humanos. El triclabendazol es una droga segura, debido a los mínimos efectos secundarios que ocasiona; se administra en dosis única a razón de 10 mg /kg, y puede repetirse a las 24 horas, con esta dosis se han obtenido grandes éxitos en el tratamiento de las fasciolosis aguda y crónica, además de ser la única con eficiencia en la eliminación de los parásitos inmaduros, tanto en el hombre como en los animales. La aparición de resistencia al triclabendazol en varias partes del mundo ha hecho que en la actualidad se haya ensayado combinar el triclabendazol con derivados de la artemisina con resultados satisfactorios, incluso empleando estos últimos derivados como monodroga (Cruz *et al.*, 1999; Vara *et al.*, 2006; Mamani & Condori, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012).

1.7. Respuesta inmune

Respuesta inmune a parásitos helmintos

Los helmintos parásitos activan diferentes mecanismos de inmunidad innata, a menudo estos organismos pueden sobrevivir y desarrollarse en sus hospederos gracias a su capacidad para superar estas defensas. Los fagocitos se enfrentan a los helmintos parásitos mediante la secreción de sustancias biocidas, debido a que estos organismos son muy grandes para poder ser fagocitados. Muchos helmintos tienen tegumentos gruesos que les permiten resistir los mecanismos citocidas de los neutrófilos y macrófagos; algunos también, pueden activar la vía alternativa del complemento, aunque los parásitos recuperados de hospederos infectados parecen

haber desarrollado una resistencia a la lisis mediada por el complemento (Abbas *et al.*, 2008).

Los helmintos son muy variables en sus propiedades estructurales y bioquímicas, sus ciclos vitales y sus mecanismos patogénicos. Por tanto, no resulta sorprendente que los diferentes parásitos desencadenen reacciones inmunitarias peculiares. En general, los helmintos han evolucionado para sobrevivir en los tejidos extracelulares, por lo que su eliminación depende a menudo de tipos especiales de respuestas de anticuerpos como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Duffus & Franks, 1980; Miller *et al.*, 2009).

La defensa contra muchas infecciones por helmintos depende de la activación de los linfocitos T_H2 , que favorece la síntesis de anticuerpos IgE y la activación de eosinófilos. Los anticuerpos IgE que se unen a la superficie de los helmintos pueden activar los mastocitos, y los anticuerpos IgG e IgA aproximan a los eosinófilos a los helmintos y los activan para que liberen el contenido de sus gránulos. Las acciones combinadas de los mastocitos y los eosinófilos dan lugar a la expulsión y la destrucción de los parásitos. En las infecciones por helmintos es frecuente observar una producción de anticuerpos IgE específicos y eosinofilia, respuestas originadas por la estimulación del subgrupo T_H2 de linfocitos T cooperadores $CD4^+$, unas células que secretan IL-4 e IL-5. La IL-4 estimula la síntesis de IgE y la IL-5 facilita el desarrollo y la activación de los eosinófilos. Estos últimos resultarían más eficaces en la eliminación de los helmintos que otros tipos de leucocitos, ya que la proteína básica principal de los gránulos eosinófilos puede ser más tóxica para estos organismos que las enzimas proteolíticas y los intermediarios reactivos de oxígeno producido por los neutrófilos y los macrófagos (Doy & Hughes, 1982; O'Neill *et al.*, 2000; Piedrafita *et al.*, 2001; Abbas *et al.*, 2008).

La respuesta adaptativa a los parásitos helmintos también puede contribuir a la lesión de los tejidos. Algunos helmintos y sus productos inducen la aparición de respuestas granulomatosas con fibrosis asociada. Una característica poca habitual de los granulomas, especialmente en ratones, es la asociación a respuestas de linfocitos T_H2 , cuando generalmente los granulomas son inducidos por la respuesta de linfocitos T_H1 . Estos granulomas inducidos por los linfocitos T_H2 se pueden deber a procesos de la activación alternativa de los macrófagos inducida por la IL-4 e IL-13. Las infestaciones parasitarias crónicas y persistentes suelen asociarse a la formación de complejos de antígenos parasitarios y anticuerpos específicos. Estos complejos pueden depositarse en los vasos sanguíneos, con desarrollo de vasculitis, o en los glomérulos renales, con la consiguiente nefritis (Brown *et al.*, 1994; Abbas *et al.*, 2008; Flynn & Mulcahy, 2008).

La evasión de los mecanismos inmunitarios por parte de los parásitos helmintos es la reducción de su capacidad inmunogénica como en el caso de los tremátodos que recambian la superficie tegumentaria durante su desarrollo dentro del hospedero, y la inhibición o modulación de las respuestas inmunitarias del hospedero (Brady *et al.*, 1999; Donnelly *et al.*, 2005; Abbas *et al.*, 2008; Bautista & Lebrija, 2008; Flynn & Mulcahy, 2008).

Respuesta inmune a *Fasciola hepatica*

Debido a que la interacción de cada parásito helminto con su respectivo hospedero es única, las respuestas inmunológicas que desencadenan y los mecanismos de evasión a las respuestas inmunológicas de *Fasciola hepatica* han sido estudiados exhaustivamente en modelos animales (*in vivo*) y utilizando los componentes celulares y moleculares de la respuesta inmune específica *in vitro*. Los estudios indican que la respuesta inmune del huésped frente a las fasciolosis sigue los lineamientos generales observados en otros parásitos helmintos, pero existen

mecanismos moleculares sólo observados en *Fasciola hepatica*. La peculiaridad se basa en el empleo de rutas moleculares de señalización intracelular que provocan la modulación de la respuesta inmune mediante la activación alternativa o acrecentada de componentes celulares como los linfocitos T (CD4⁺, CD8⁺, γ/δ) y macrófagos. Esta modulación de la respuesta inmune es mediada por los componentes solubles provenientes de la batería bioquímica que secretan y productos metabólicos que excretan los ejemplares juveniles y adultos de *Fasciola hepatica*, los cuales desencadenan cambios a nivel celular y molecular en diversos linajes de leucocitos (Brown *et al.*, 1994; Piedrafita *et al.*, 2004; Espino *et al.*, 2007; Piedrafita *et al.*, 2007; Dowling *et al.*, 2010; Moreau & Chauvin, 2010; El-Ahwany *et al.*, 2012). Por lo tanto la evasión de la respuesta inmune de *Fasciola hepatica*, se debe a las peculiares rutas moleculares que desencadenan sus productos de excreción-secreción y el recambio en la superficie tegumentaria durante su desarrollo dentro del hospedero (Díaz *et al.*, 1998; Siemieniuk *et al.*, 2008; Beckham *et al.*, 2009; Hamilton *et al.*, 2009; Cancela *et al.*, 2010). Además el éxito de la infección por *Fasciola hepatica* está condicionado al número de metacercarias que ingresan al hospedero; cuanto mayor sea este número el sistema inmune del hospedero no se dará abasto, garantizando que un grupo considerable de juveniles logre establecerse con éxito en los conductos biliares o hepáticos (Ordóñez, 2010).

2. ANTÍGENOS PARASITARIOS

Los antígenos son moléculas que se unen a los anticuerpos, receptor del linfocito T, receptores tipo *Toll* y a las diferentes moléculas que componen el sistema inmune innato humoral. La naturaleza química del antígeno es variables encontrándose carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleídos, lo cual determina como será reconocido por el sistema inmune, en el caso de los receptores de los linfocitos T sólo reconocen antígenos de naturaleza proteica, mientras que los anticuerpos anclados en la membrana de los linfocitos B o secretados por los plasmocitos pueden reconocer los antígenos de cualquier naturaleza química (Abbas *et al.*, 2008).

Los antígenos parasitarios fueron inicialmente agrupados según la manera que fueron obtenidos; los denominados antígenos somáticos, a partir del parásito entero o sus huevos mediante extractos totales y los antígenos de excreción-secreción mediante el mantenimiento *in vitro* de ejemplares juveniles o adultos. A medida que se perfeccionaron los métodos de aislamiento y purificación de los antígenos según su naturaleza química, los antígenos parasitarios se agruparon en funcionales y estructurales, siendo los funcionales aquellos que por su naturaleza química y estereoquímica poseen capacidad inmunogénica y por ende son de utilidad para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y la elaboración de vacunas (Kagan, 1967; Hillyer, 1980). Uno de los descubrimientos que influyeron en la concepción de las infecciones parasitarias fue el hallazgo de carbohidratos, lípidos y proteínas presentes tanto en los parásitos como en sus hospederos vertebrados; lo cual sumado a la existencia de reactividad cruzada o las denominadas comunidades antigénicas entre parásitos de diferentes grupos taxonómicos, enfatizó el problema de encontrar inmunógenos específicos para cada parásito e incapaces de provocar reacciones autoinmunes en los animales y el hombre (Sánchez, 1992; Alarcón *et al.*, 2001). En la actualidad la tecnología del ADN recombinante, disciplinas como la genómica y

proteómica, han aportado grandes avances destinados en la obtención de antígenos de calidad para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y posibles candidatos vacunales para las diversas parasitosis que aquejan a la humanidad (O'Neill *et al.*, 1999; Solis *et al.*, 2004; Revilla *et al.*, 2005; Rinaldi *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2011).

3. ANTÍGENOS DE *Fasciola hepatica*

Los antígenos funcionales de *Fasciola hepatica*, se encuentran en sus productos de excreción–secreción; los componentes de estos productos se conocen exhaustivamente y actualmente se conoce las secuencias de ácidos nucleídos (transcriptos de ARN) que codifican estos componentes, cuya naturaleza química es glicoproteica y constituyen importantes proteínas que permiten la invasión, subsistencia y evasión de la respuesta inmune en el hospedero (Villa *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2009; Cancela *et al.*, 2010; Espino *et al.*, 2010; Figueroa-Santiago *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012). Se ha demostrado que *Fasciola hepatica* en su desarrollo dentro del hospedero sufre un importante recambio en la superficie tegumentaria que constituye un mecanismo de evasión a la respuesta inmunológica del hospedero; en relación con este recambio, sobre el tegumento del parásito se ha identificado la presencia de gránulos secretorios que se transforman desde gránulos T0 característicos del parásito joven recién desenquistado, a gránulos de tipo T1 y T2 que caracterizan al parásito inmaduro y maduro, respectivamente; a su vez se demuestra que estas estructuras fisiológicamente diferentes, poseen componentes antigénicos comunes que están muy relacionados con los antígenos de excreción-secreción, que en cada estadio el parásito libera al medio circundante (Díaz *et al.*, 1998). La lista de glicoproteínas que componen los productos de excreción–secreción es variada y extensa, pero se destacan las proteínas de unión a ácidos grasos, cisteína-proteasas, leucin aminopeptidasa y proteínas del tipo saponina, las cuales según estudios de genómica y proteómica, se encuentran presentes en las diferentes etapas de la ontogenia del parásito, lo cual los sitúa como candidatos vacunales debido a la posibilidad de inducir protección inmunitaria en las diferentes fases de la infección por fasciolosis (Dalton *et al.*, 1996; Fredes *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 1998; O'Neill *et al.*, 1998; Rokni *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005; McManus & Dalton, 2006). La familia de cisteína-proteasas y las proteínas del tipo saponina, son los grupos más estudiados en

la actualidad; en la familia de cisteína-proteasas (Catepsina L) se conoce que las células encargadas de secretarlas se encuentran a nivel de la gastrodermis (Wilson *et al.*, 1998; Fredes *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Law *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004; Naranjo, 2008; Morphew *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2011). Inicialmente las proteínas de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, se agrupaban mediante rangos de masas moleculares obtenidos mediante electroforesis y evaluados por *Western blot*, para determinar su inmunogenicidad; lo cual permitió agrupar a las proteínas de masa molecular menor a 30 kDa como útiles para el inmunodiagnóstico y posibles candidatos vacunales, en la actualidad este grupo de proteínas incluyen a la familia de cisteína-proteasas y las proteínas del tipo saponina (Gorman *et al.*, 2000; Espino *et al.*, 2000; Colmenares *et al.*, 2007; Morphew *et al.*, 2007; Marcilla *et al.*, 2008; Meshgi *et al.*, 2008).

4. ANTECEDENTES

Para elaborar métodos de diagnóstico y vacunas, para las diversas parasitosis ocasionadas por helmintos, varios autores han preparado antígenos a partir del parásito entero, tegumento, huevo, coproantígenos y productos de excreción-secreción del parásito (Kagan *et al.*, 1967; Hillyer, 1980; Allan & Craig, 1989; Espino & Finlay, 1994; Abdel-Rahman & Abdel-Mageed, 2000). Se ha demostrado que los antígenos más inmunodominantes y abundantes de los parásitos *Fasciola gigantica* y *Fasciola hepatica*, son los antígenos de excreción-secreción (Wijffels *et al.*, 1994), de los cuales el componente principal pertenece a la familia de cisteína-proteasas denominadas catepsinas L (O'Neill *et al.*, 1998), que pueden ser detectados en suero vacuno en la primera semana de infección y en heces a partir de la cuarta semana de infección (Almazan *et al.*, 2001). Los antígenos de excreción-secreción de *Fasciola* spp., o sus componente parcialmente purificados son la fuente más común de antígenos usados en pruebas serológicas (Gonenc *et al.*, 2004).

Los antígenos excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, han sido utilizados, para la elaboración de varias pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos, de las cuales el *ELISA* indirecto es la prueba serológica que ha dado los resultados más sobresalientes, siendo capaz de detectar anticuerpos específicos en suero vacuno a partir de la quinta semana de iniciada la infección por *Fasciola hepatica* (O'Neill *et al.*, 1998). No obstante, la persistencia de anticuerpos después de la infección o tratamiento, no permiten utilizar el *ELISA* indirecto, para monitorear eficazmente la quimioterapia; además existen reportes que el *ELISA* indirecto también puede detectar anticuerpos específicos contra otras parasitosis, lo cual no permite tener la certeza del diagnóstico (Carnevale *et al.*, 2001).

Actualmente las pruebas serológicas basadas en la detección de antígenos, han sido desarrolladas por diversos grupos de investigación; entre estas pruebas el

ELISA tipo *sandwich* (*ELISA sandwich*), es la prueba que ha logrado resultados alentadores. Se han ensayado varias variantes de esta prueba, utilizando anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales, para sensibilizar las placas y poder capturar antígenos circulantes en suero y coproantígenos (Espino *et al.*, 1990; Estuningsih *et al.*, 2009; Rabia *et al.*, 2010).

En Egipto e Indonesia, debido a la prevalencia alta de infecciones con *Fasciola gigantica*, en las ovejas y vacas destinadas al comercio; se empezó a desarrollar varias pruebas serológicas, para el diagnóstico temprano y certero de la fasciolosis, siendo elegida la prueba de *ELISA sandwich*, por su capacidad de detectar antígenos de excreción-secreción y su probada superioridad frente a otras pruebas de diagnóstico; siendo desarrollado un *ELISA* con estas características, por el Instituto de Ciencias Veterinarias de Indonesia, en el cual las placas se sensibilizaron con un anticuerpo monoclonal de la clase IgG1 elaborado en ratones Balb/c, para capturar antígenos específicos presentes en heces de vacas con fasciolosis, obteniéndose una sensibilidad del 95% y una especificidad del 91%. El sistema *ELISA sandwich* estaba formado por dos anticuerpos monoclonales distintos, donde el segundo anticuerpo se encuentra unido a moléculas de biotina, el límite de detectabilidad de este sistema fue 200 ng/mL en PBS (Estuningsih *et al.*, 2009). En el año 2010, el Instituto de Investigación Theodor Bilharz de Egipto, desarrollo un *ELISA sandwich*, en el cual las placas se sensibilizaron con anticuerpos policlonales de la clase IgG, elaborados en conejos albinos, producidos contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola gigantica*, para capturar antígenos específicos en suero y heces de ovejas con fasciolosis. Además, se comparó la sensibilidad y especificidad obtenidos con los resultados por *DOT-ELISA* obteniendo para el *ELISA sandwich*, 96.6 y 96.7% y para *DOT-ELISA*, 98.9 y 98.3%, respectivamente. El sistema *ELISA sandwich* elaborado consistió de dos anticuerpos donde el segundo anticuerpo conjugado con la enzima

peroxidasa era igual al anticuerpo de captura; el límite de detectabilidad de este sistema fue 1 ng/mL en PBS (Rabia *et al.*, 2010).

En España Sánchez-Andrade *et al.* (2000), desarrollaron un *ELISA sandwich*, basado en anticuerpos policlonales de la clase IgG, elaborados en conejos albinos, producidos contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, para detectar antígenos específicos en suero de ganado vacuno. Además compararon la prueba con un *ELISA* indirecto para detección de anticuerpos determinando una sensibilidad y especificidad para el *ELISA* indirecto de 92 y 94.4 % y para *ELISA sandwich* de 86 y 100 %, respectivamente. El sistema *ELISA sandwich* consistió de dos anticuerpos donde el segundo anticuerpo era igual al anticuerpo de captura. En el año 2004 Mezo *et al.*, desarrollaron un *ELISA sandwich*, en el cual los anticuerpos monoclonales de ratón de la clase IgG fueron empleados como anticuerpos de captura y donde el segundo anticuerpo fue igual al anticuerpo de captura, ambos denominados MM3; este sistema es considerado ultrasensible debido a la capacidad de detectar entre 1 a 7 ejemplares adultos de *Fasciola hepatica* en los hígados de ganado ovino y bovino, en el 100% de los casos evaluados. El límite de detectabilidad fue una concentración de antígenos de excreción- secreción de *Fasciola hepatica* entre 0.3 y 0.6 ng/mL, lo cual se determino comparando el punto de corte obtenido después de su aplicación en el campo evaluando muestras de heces.

Almazán *et al.* (2001), desarrollaron en México un *ELISA* tipo *sandwich*, basado en anticuerpos policlonales de la clase IgG, elaborados en conejos albinos, producidos contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, para capturar antígenos específicos en suero y heces de ganado ovino infectado experimentalmente; determinando una sensibilidad de 86.6 % para antígenos en suero y una sensibilidad de 93.3% en heces. El sistema *ELISA sandwich* fue un sistema de dos anticuerpos donde el segundo anticuerpo era igual al anticuerpo de captura conjugado con la enzima peroxidasa. El límite de detectabilidad de los antígenos de excreción-secreción

fue 50 ng/mL, diluidos en PBS suplementado con 0.3% *Tween 20* y de 20 ng/mL cuando se diluyo en PBS suplementado con 0.3% *Tween 20* y SAB al 0.1%.

En 1990, el Instituto Pedro Kourí de Cuba desarrollo el *kit* de diagnóstico FASCIDIG®; el cual emplea un anticuerpo monoclonal de la clase IgG 2a (AcM ES78), elaborados en ratones, para detectar antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* presentes en suero y heces de animales infectados; este *kit* FASCIDIG® ha sido ampliamente utilizado para el diagnóstico de fasciolosis en humanos y animales, dando en el caso de fasciolosis humana una sensibilidad del 94% y una especificidad del 91%. El *ELISA sandwich* consta de dos anticuerpos, donde el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón y el segundo anticuerpo es un anticuerpo policlonal IgG de conejo conjugado con la enzima peroxidasa; el límite de detectabilidad de los antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* fue de 10 ng/mL cuando se diluyo en suero de pacientes negativos para fasciolosis, lo cual se determino comparando el punto de corte obtenido después de su aplicación en el campo (Espino *et al.*, 1990; Espino & Finlay, 1994; Duménigo & Finlay, 1998).

En el Perú se ha aplicado el *kit* de diagnóstico FASCIDIG®, para el diagnóstico de fasciolosis en humanos, ovejas, vacas y alpacas, (Torrel, 1997; Colona *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005).

Torrel, en 1997, analizó muestras de heces procedentes de ganado ovino y bovino, procedentes de la ciudad de Cajamarca, mediante el examen coproparasitológico y el *kit* FASCIDIG®; los resultados de ambas pruebas fueron confirmados con el hallazgo del parásito en la necropsia. Mediante examen coproparasitológico se obtuvo una prevalencia de fasciolosis ovina y bovina de 69.4 y 71.1%, respectivamente y una sensibilidad para muestras procedentes de ovejas y vacas de 75.6 y 71.7%, respectivamente. Con el *kit* de diagnóstico FASCIDIG® se

obtuvo una prevalencia de fasciolosis ovina y bovina de 90.5 y 95.5%, respectivamente y una sensibilidad para muestras procedentes de ovejas y vacas de 98.7 y 97.7%, respectivamente. La especificidad de ambas pruebas fue del 100% para el diagnóstico de fasciolosis en ovinos y bovinos.

Colona *et al.* (2001), evaluaron los antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, en muestras de heces de ganado vacuno procedente de áreas endémicas de la Región Junín (Sierra Central), mediante los métodos inmunológicos de *ELISA* (*kit* de diagnóstico FASCIDIG® y hemaglutinación indirecta (HAI), correlacionándolos con el método coproparasitológico de Dennis (CD). Se determinó una correlación significativa entre el método de FASCIDIG® y el CD, lo que indica que un diagnóstico por *ELISA* permite conocer la enfermedad durante la fase prepatente o patente en relación al CD, que diagnostica la enfermedad durante la fase patente. El diagnóstico de la infección o prevalencia por HAI, *ELISA sandwich* y CD fue 35.8%, 42.5% y 37.7% respectivamente. Este estudio permitió determinar la eficiencia del *ELISA*- FASCIDIG® como el método que posibilitaría el diagnóstico de la fasciolosis durante la fase prepatente y patente de la enfermedad. El FASCIDIG® obtuvo 60% de sensibilidad, 68.2% de especificidad, un valor predictivo positivo de 53.3% y un valor predictivo negativo de 73.8%.

Castro *et al.* (2002), evaluaron el *kit* de diagnóstico FASCIDIG®, para el diagnóstico de *Fasciola hepatica*, en muestras fecales de bovinos. Las muestras fueron obtenidas del Departamento de Junín. Los resultados obtenidos fueron comparados con el examen coproparasitológico convencional. El *kit* de diagnóstico FASCIDIG®, presentó 87.6 % de sensibilidad; 71.4 % de especificidad y valores predictivos positivo y negativo de 55.8 %, y 90.1 % respectivamente. La alta sensibilidad y especificidad obtenidas al utilizar *kit* de diagnóstico FASCIDIG® permitió determinar su utilidad en el diagnóstico de la fasciolosis bovina.

Li *et al.* (2005), estandarizaron la prueba de *ELISA* indirecta para la detección de anticuerpos y evaluaron el *kit* de diagnóstico FASCIDIG®, para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en alpacas. Los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo fueron del 100% para las dos pruebas de *ELISA*. Ambas pruebas pueden sustituir al examen coproparasitológico, tanto en el diagnóstico individual, como en rebaños con infección por *Fasciola hepatica*. El *ELISA* indirecto demostró ser un método sensible y útil para el diagnóstico de fasciolosis pasiva en alpacas. El *ELISA sandwich* para la detección de coproantígenos es un método simple, rápido y eficaz en la detección de infección activa por *Fasciola hepatica*. Ambos métodos de diagnóstico resultan ser una técnica de elección para estudios seroepidemiológicos en rebaños de gran número de animales sometidos a pastoreo intensivo.

La variabilidad genética presente en *Fasciola hepatica* ha sido reportada en todas las regiones geográficas donde infecta; y es considerada indispensable en el momento de valorar la utilidad de posibles vacunas y métodos de inmunodiagnóstico, debido a que la divergencia genética poblacional de *Fasciola hepatica* limita la escala geográfica en la cual serían eficaces. La variabilidad genética (haplotipos) se manifiesta mediante la aparición de cepas de *Fasciola hepatica* resistentes al triclabendazol, lo cual también ha sido reportado en el Perú (Vargas *et al.*, 2003; Ortiz, 2011; Vázquez, 2012).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis:

Los antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, pueden ser detectados mediante la aplicación de un *kit ELISA* tipo *sandwich*.

2. Objetivo General:

- Desarrollar un *kit ELISA* tipo *sandwich*, para la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.

3. Objetivos Específicos:

- Preparar antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.
- Obtener anticuerpos de conejo contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.
- Obtener anticuerpos de ratón contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.
- Desarrollar y estandarizar un *kit ELISA* tipo *sandwich*, para la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.
- Determinar el límite de detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* mediante el *kit ELISA* tipo *sandwich*.
- Evaluar la especificidad, sensibilidad y valores predictivos del *kit ELISA* tipo *sandwich* propuesto con relación a la Contrainmunolectroforesis y coparásitológico directo, para la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Preparación de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AgESFh)

Las fasciolas vivas de los conductos biliares de bovinos fueron colectadas en Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (SSAF) estéril pH 7.2. Se lavaron seis veces con solución salina fisiológica (SSF) y se seleccionaron las fasciolas que presentaban movimiento y/o se mantenían estiradas, las cuales fueron sumergidas durante diez minutos en SSAF + Merthiolate (1:14000), seguidamente las fasciolas se lavaron dos veces con SSF y se colocaron en matraces con medio RPMI 1640 con 100 µg/mL de estreptomicina y 100 µg/mL de ampicilina, a razón de una fasciola por mililitro de medio, en donde se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Después de mantener *in vitro* a los ejemplares vivos de *Fasciola hepatica*, se procedió a colectar el medio RPMI -1640 en baño de hielo y separar por centrifugación (16000 rpm a 4°C durante 5 minutos) los antígenos metabólicos de *Fasciola hepática*. El sobrenadante obtenido se filtró al vacío utilizando membranas Millipore® de 0.2 µm, seguidamente se recuperó el filtrado y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

Los antígenos de excreción-secreción obtenidos fueron liofilizados en el Laboratorio Especializado de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, para lo cual el antígeno se alicuotó en viales de vidrio y seguidamente se inició el proceso de liofilización; el cual tuvo una duración de 12 horas. Los antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* liofilizados, para poder ser empleados en las diferentes pruebas de Inmunodifusión doble (IDD), Inmunoensayo en capa fina (ICF) y Contraimmunoelectroforesis (CIEF) y *ELISA sandwich* fueron solubilizados con solución salina fisiológica, SSAF y PBS 0.01M

respectivamente. Se preparó una solución de trabajo de 1mg/mL. En el Anexo 1 se resume el procedimiento empleado en la preparación de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.

1.1. Evaluación de los antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* mediante Electroforesis *SDS-PAGE*, en condiciones disociantes y reductoras

Se utilizó una solución de acrilamida-bisacrilamida (30-0.8%), y se preparó los geles resolutivo y concentrador a una concentración de 12 y 4%, respectivamente. Los antígenos obtenidos fueron diluidos v/v con solución de lisis, para luego ser incubado a 100 °C por 6 minutos. Se evaluaron diferentes concentraciones de antígeno, las cuales fueron llevadas a un volumen final de 10 µL. Los geles fueron corridos a un voltaje constante de 100 V, durante aproximadamente 3 horas. Después se colorearon con azul de Coomassie durante 30 minutos, seguidamente se decoloraron exhaustivamente hasta la observación de las bandas. Se empleó el marcador *Trail mix*®, para determinar la masa molecular (en kilo Dalton) de las proteínas presentes en el antígeno obtenido.

2. Elaboración de suero hiperinmune de conejo

Se inmunizó una coneja blanca de raza Nueva Zelanda (Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud) de 2 Kg de peso, con cuatro dosis de 0,25 mg de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. La primera inoculación fue vía subcutánea empleando el coadyuvante completo de Freund (CCF) y las tres restantes fueron inoculadas vía intramuscular empleando el coadyuvante incompleto de Freund (CIF); el intervalo entre cada dosis fue de 15 días. El suero obtenido de las sangrías parciales fueron evaluadas por inmunodifusión doble (IDD) e inmunolectroforesis (IEF) para determinar el nivel de producción de anticuerpos durante el protocolo de inmunización. Una semana después de administrar la última dosis se realizó la sangría total vía punción cardíaca, se separó el suero y se

almacenó a -20°C hasta su uso. La determinación del título de anticuerpos se realizó mediante la técnica de inmunoensayo en capa fina (ICF).

2.1. Titulación de suero hiperinmune de conejo

Para la titulación del suero hiperinmune de conejo se realizó la prueba de Inmunoensayo en capa fina (ICF), para lo cual se sensibilizaron placas Pétri de plástico desengrasadas (100 mm de diámetro) con 15 mL de una solución de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, diluidos en solución salina fisiológica con una concentración de proteínas de 180 µg/mL; seguidamente las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 37°C por 30 minutos, después de la incubación se descartó la solución de antígenos y se secó las placas con la ayuda de un ventilador. Se preparó diluciones del suero obtenido con SSAF, empleando un factor de dilución de 2, desde 1/2 hasta 1/4096 y se agregó 5 µL de cada dilución (dejando una distancia de 1 cm entre cada dilución) sobre la superficie de las placas sensibilizadas, las cuales fueron incubadas en cámara húmeda a 37°C por una hora. Después de la incubación se llenó las placas con agua destilada caliente (60°C) e inmediatamente se invirtió sobre sus tapas por 60 segundos, seguidamente se lavó tres veces las placas con agua destilada y se secaron con la ayuda de un ventilador. Para la lectura de la prueba se invirtió durante 120 segundos las placas sensibilizadas sobre otras placas que contenían agua destilada caliente (60°C).

2.2. Separación de anticuerpos policlonales de conejo

Mediante la técnica de precipitación por salado, se obtuvieron los anticuerpos policlonales de conejo a partir del suero obtenido, utilizando una solución saturada de sulfato de amonio (SSSA) al 45%, y diálisis exhaustiva con solución salina fisiológica (Torrico; 2000). El dializado obtenido fue concentrado por liofilización, después solubilizado con una alícuota de *buffer* fosfato salino 0.01 M pH 7.2 (PBS) para

obtener una solución *stock* de 4 mg/mL, a partir de la cual se preparó una solución de trabajo de 2 mg/mL, los anticuerpos fueron almacenados a -20°C hasta su uso. La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford.

3. Elaboración de suero hiperinmune de ratón

Se inmunizó 10 ratonas de la línea Balb/c (Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud) de seis semanas de nacidas, con tres dosis de 50 µg de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. La primera dosis fue inoculada vía subcutánea empleando el coadyuvante completo de Freund (CCF), la segunda dosis fue inoculada vía intramuscular empleando el coadyuvante incompleto de Freund (CIF) y la tercera dosis fue inoculada vía subcutánea empleando el CIF; el intervalo entre cada dosis fue de 15 días. Finalmente 10 días después de administrar la última dosis se realizó la sangría total vía punción cardíaca, se separó el suero y se almacenó a -20°C hasta su uso. La evaluación del suero se realizó mediante la técnica de contrainmunolectroforesis (CIEF) y la determinación del título de anticuerpos por la técnica de inmunoensayo en capa fina (4.2.1).

3.1. Separación de anticuerpos policlonales de ratón

Mediante la técnica de precipitación por salado, se obtuvieron los anticuerpos policlonales de ratón a partir del suero obtenido, utilizando una solución saturada de sulfato de amonio (SSSA) al 50%, y diálisis exhaustiva con solución salina fisiológica (*Current Protocols in Immunology*). El dializado obtenido fue concentrado por liofilización, después solubilizado con una alícuota de *buffer* fosfato salino 0.01 M pH 7.2 (PBS) para obtener una solución *stock* de 4 mg/mL, a partir de la cual se preparó una solución de trabajo de 2 mg/mL, los anticuerpos fueron almacenados a -20°C hasta su uso. La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford.

4. Desarrollo del *ELISA sandwich*

El diseño del *ELISA sandwich*, constó de ocho fases: fase I de sensibilización, se empleó como fase sólida placas de poliestireno de 96 pocillos *ImmulonII*® y como anticuerpo de captura, se empleó anticuerpos policlonales de ratón contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* diluidos en *buffer* fosfato salino 0.01 M pH 7.2 (PBS); fase II de bloqueo con Seroalbúmina bovina al 1% en PBS (SAB-PBS); fase III de muestras y controles (control negativo: 25 µg/mL de SAB en PBS y control positivo: 25 µg/mL de antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* en PBS); fase IV del segundo anticuerpo, se empleó anticuerpos policlonales de conejo contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* diluidos en SAB-PBS; fase V del conjugado, se empleó anticuerpos monoclonales de ratón anti-inmunoglobulinas totales de conejo conjugados con la enzima peroxidasa, diluidos en SAB-PBS; fase VI del sustrato cromógeno, se empleó una solución tamponada de citrato fosfato 50mM pH 3.8, dimetil-sulfóxido al 4%, tetrametilbenzidina (TMB) al 0.03% y peróxido de hidrógeno al 0.02%; fase VII de detener la reacción con una solución de ácido sulfúrico 0.3M; y fase VIII, de lectura de las placas en un lector de *ELISA* (SINNOWA) a 450 nm. Al final de cada fase, hasta la fase V, se realizó un lavado con *buffer* fosfato salino-*Tween 20* (PBS-T).

4.1. Estandarización del sistema *ELISA sandwich*

I. Sensibilización o recubrimiento: Se ensayó 3 concentraciones de anticuerpo de captura: 1, 5 y 10 µg/mL. Se incubó a 4°C durante toda la noche.

Solución de tamizaje o recubrimiento (*buffer coating*): *Buffer* fosfato salino 0.01 M pH 7.2 (PBS).

II. Bloqueo: Se empleó Seroalbúmina bovina al 1% en PBS (SAB-PBS). Se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.

III. Antígeno: Se aplicó por duplicado una concentración conocida de antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (control positivo), acorde a los trabajos de Espino *et al.*, 1990. Se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 2 horas.

Controles de la prueba:

- **Control positivo (C+):** Se agregó 25 µg/mL de antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* en PBS.
- **Control negativo (C-):** Se agregó 25 µg/mL de SAB en PBS.
- **Blancos (B):** Se emplearon dos blancos, en ambos se agregó PBS en lugar del antígeno; al primer blanco se agregó el segundo anticuerpo y en el caso del segundo blanco se agregó SAB-PBS en lugar del segundo anticuerpo.

IV. Segundo anticuerpo: Se ensayó 3 concentraciones del segundo anticuerpo: 1, 5 y 10 µg/mL para cada recubrimiento. Se incubó a 4°C durante toda la noche.

V. Conjugado: Se ensayó 2 diluciones del conjugado: 1/500 y 1/1000; para cada ensayo de recubrimiento.

Interfases: Entre cada fase, hasta la fase V, se realizaron 4 lavados con solución de lavado (0.05% de *Tween 20* en PBS 0.01 M pH 7.4), cada lavado tuvo una duración de 1 minuto.

4.2. Determinación del límite de detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AgESFh) por *ELISA sandwich*

Para determinar el límite de detección de AgESFh por *ELISA sandwich*, se preparó diluciones del AgESFh empleando como diluyentes: PBS y agua destilada (diluyente empleado en el procesamiento de muestras de heces), las diluciones se prepararon por duplicado, empleando un factor de dilución 2, desde una concentración inicial de 25 µg/mL hasta obtener una concentración final de 0.02 µg/mL.

4.3. Detección de coproantígenos (AgESFh en muestras de heces) por CIEF y *ELISA sandwich*

Las muestras de heces de ganado ovino (n=31) obtenidas directamente del recto de cada animal fueron colocadas en bolsas de plástico con cierre hermético, y procesadas mediante homogenización con tres mililitros de agua destilada por cada gramo de heces. Se dejó sedimentar toda la noche a 4°C y se recuperó el sobrenadante, el cual denominamos muestra procesada. Las muestras procesadas fueron alicuotadas y almacenadas a -20°C hasta su uso. Previamente al procesamiento, se realizó el examen coproparasitológico directo para determinar las muestras positivas o negativas para fasciolosis. Las muestras procesadas se analizaron en paralelo mediante *ELISA sandwich* y contraelectroforesis (CIEF). La prueba de CIEF se realizó acorde a Morilla & Bautista (1986), con algunas modificaciones.

4.4. Punto de corte (*Cut off*) del *ELISA sandwich*

Se analizó por *ELISA sandwich* muestras procesadas negativas para fasciolosis, por examen coproparasitológico directo y contraelectroforesis. Las densidades ópticas (D.O) obtenidas de las muestras negativas para fasciolosis se utilizaron para determinar el punto de corte (*Cut off*) mediante la fórmula: $X + 2 \cdot SD$, donde X y SD representan la media muestral y la desviación estándar respectivamente. La fórmula escogida garantizó que el 95% de los valores de las densidades ópticas obtenidas en las muestras negativas, se encuentren alrededor de su valor promedio.

5. Análisis de resultados

Los datos se expresaron mediante la media aritmética (\bar{X}), desviación estándar (SD) o porcentaje (%). Se elaboró tablas de doble entrada, para determinar la especificidad, sensibilidad, valores predictivos positivos y negativos. Para el análisis de los datos, se utilizó los programas informáticos SPSS (versión 17 para *Windows*) y *Microsoft Excel 2003*.

V. RESULTADOS

1. Preparación de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AgESFh)

La concentración de proteínas presentes en el medio de cultivo y en el AgESFh liofilizado fue de 640 µg/mL y 4 mg/mL, respectivamente.

Las proteínas presentes en los antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, en las condiciones que fueron analizadas por electroforesis, produjeron una banda prominente de masa molecular de 23 kDa. La cual se observó en forma proporcional a la concentración de antígeno empleada en cada carril. Los resultados se muestran en la figura 1.

2. Elaboración de suero hiperinmune de conejo

Para determinar la presencia de anticuerpos de conejo anti-antígeno de excreción-secreción de *F. hepatica*; los sueros obtenidos de las sangrías parciales y sangría total fueron evaluados mediante la prueba de inmunodifusión doble (IDD) e IEF. Por la técnica de IDD se observó dos líneas de precipitación paralelas entre los pocillos, mientras que, por la técnica de IEF se determinó dos arcos de precipitación como se aprecia en la Figura 2 y Figura 3 respectivamente.

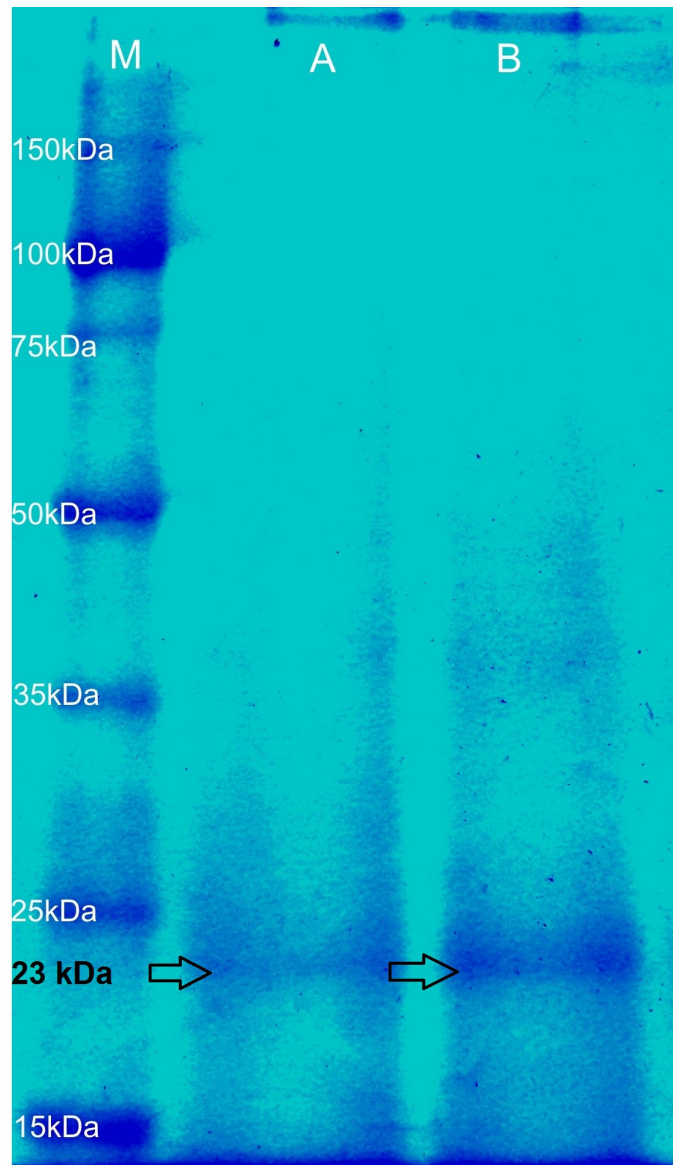


Figura 1. Electroforesis *SDS-PAGE* de los antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. Las flechas indican una banda de 23 kDa. **M:** marcador de masa molecular; **A:** 70 µg de AgESFh; **B:** 50 µg de AgESFh.

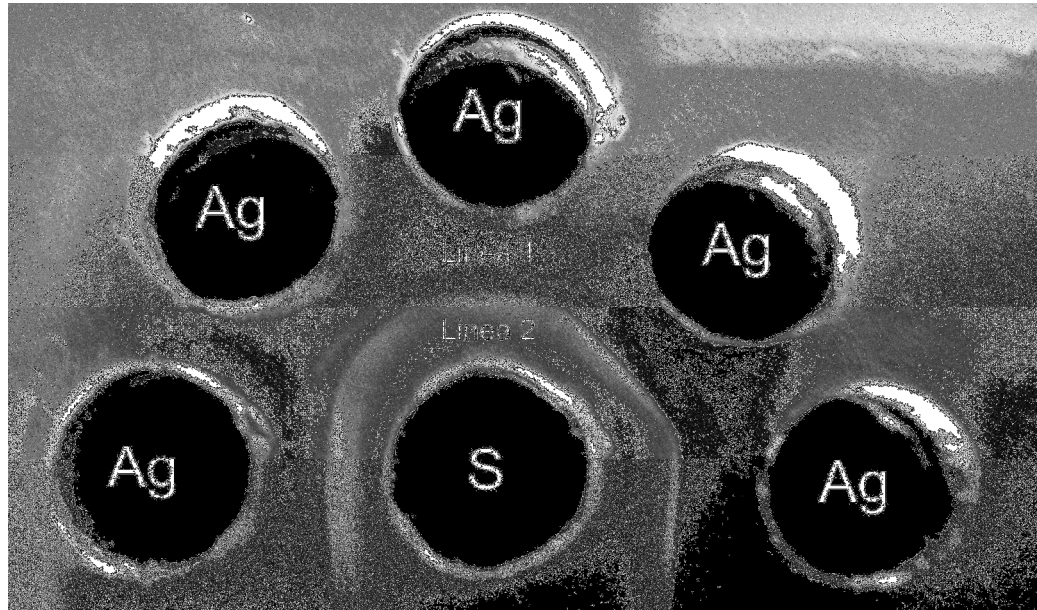


Figura 2. Prueba de inmunodifusión doble de Ouchterlony. Se muestra el patrón de líneas de precipitación característico para *Fasciola hepatica*. **S:** suero hiperinmune de conejo anti-antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*; **Ag:** antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepática*.

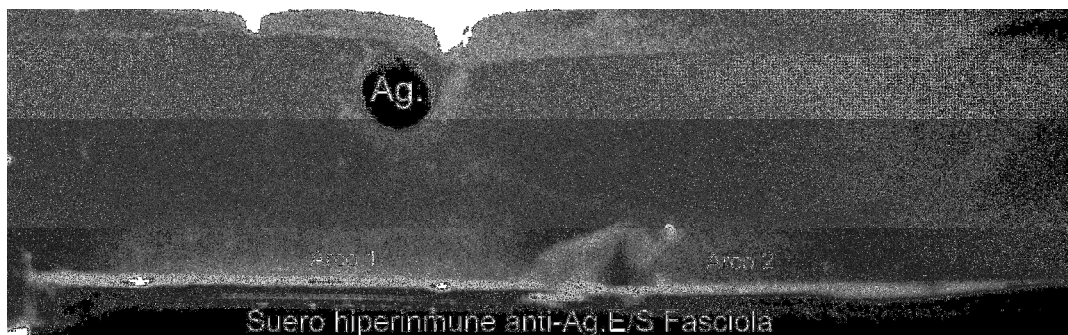


Figura 3. Prueba de inmunoelectroforesis. Se muestra dos arcos de precipitación, lo cual es característico de *Fasciola hepatica*. **Ag.:** antígeno de excreción-secreción (**E/S**) de *Fasciola hepatica*

2.1. Titulación de suero hiperinmune de conejo

EL suero de conejo anti-antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepática* fue titulado mediante la técnica de inmunoensayo en capa fina (ICF). En la figura 4 se observó una mayor condensación de agua en el control positivo (suero de conejo anti AgESFh-Seroteca del Laboratorio de Inmunología-UNMSM) y el suero problema (suero de conejo AgESFh), mientras que el control negativo (solución salina amortiguadora de fosfatos, SSAF) presentó un patrón de condensación igual a áreas donde no se aplicó el suero. El título se determinó por la condensación de agua en la reacción antígeno-anticuerpo, observándose hasta una dilución de 1:512 (Figura 5).

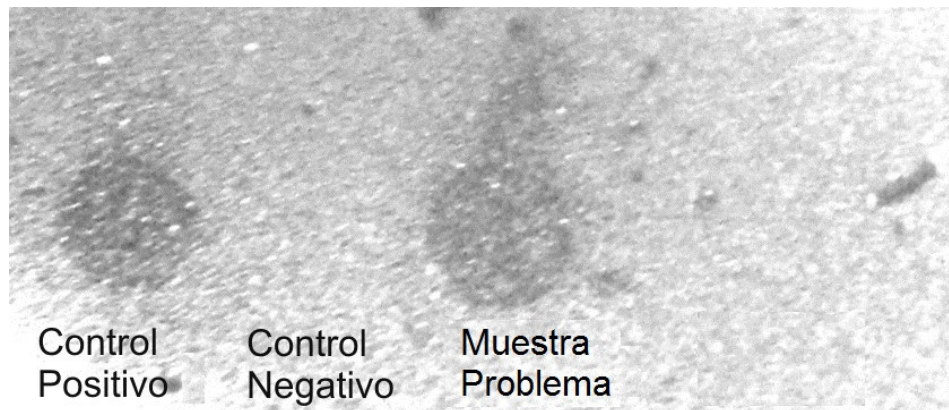


Figura 4. Controles empleados en el inmunoensayo en capa fina para la titulación del suero hiperinmune de conejo elaborado contra el antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepática*. Se muestra la diferencia en la capacidad hidrofílica (condensación) entre los controles empleados. **Control Positivo:** Suero de conejo anti-Ag. E/S de *Fasciola hepática*, sin diluir, proporcionado por la seroteca del Laboratorio de Inmunología de la UNMSM; **Control Negativo:** Solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF); **Muestra Problema:** Suero hiperinmune de conejo, sin diluir elaborado en el presente trabajo contra antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepática*.

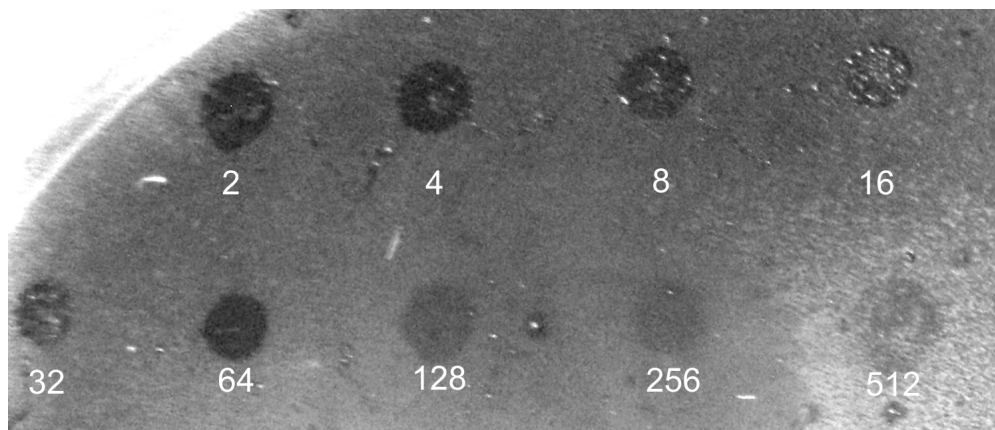


Figura 5. Titulación del suero hiperinmune de conejo elaborado contra antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, mediante ICF. Se observa similitudes en la capacidad hidrofílica (condensación) en los controles positivos, hasta la dilución de 1/512.

3. Elaboración y Titulación de suero hiperinmune de ratón

La presencia de anticuerpos de ratón contra antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* fue estimada por la técnica de CIEF. En la Figura 6 se observó la presencia de dos bandas de precipitación.



Figura 6. Prueba de Contrainmuno-electroforesis (CIEF). Se muestra dos bandas de precipitación. **Ag.**: antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*; **S**: suero hiperinmune de ratón elaborado contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*.

La titulación del suero hiperinmune de ratón anti AgESFh se realizó mediante la prueba de ICF. Del mismo modo que en la titulación del suero de conejo anti AgESFh, el control positivo (suero de conejo anti-AgESFh), el control negativo (SSAF) y la muestra problema sin diluir (suero de ratón anti-AgESFh) presentaron diferentes patrones de condensación (Figura 7). Se determino el titulo del suero hasta la dilución de 1:16 en base a la presencia de gotas de condensación con el resto de la placa (Figura 8).

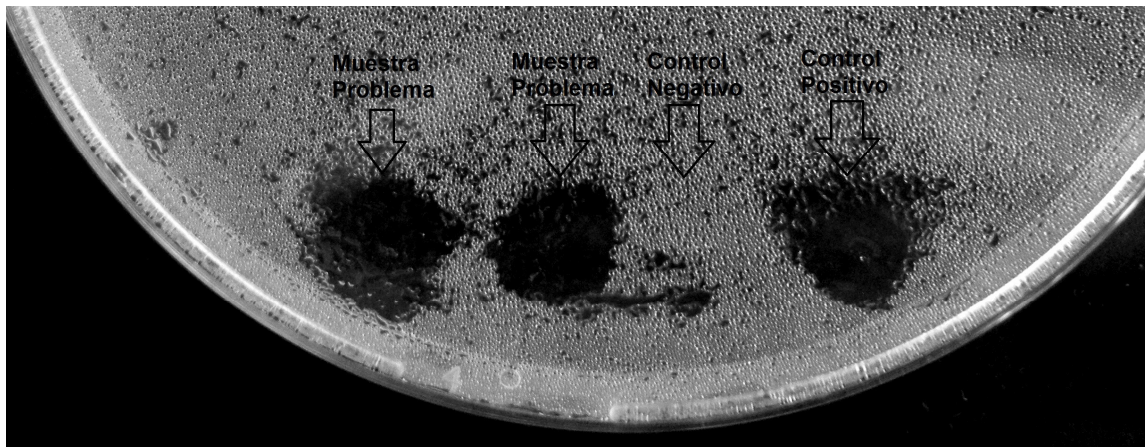


Figura 7. Controles empleados en el ICF para la titulación de anticuerpos policlonales de ratón elaborado contra antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AgESFh). Se muestra la capacidad hidrofílica (condensación) de los controles empleados. **Control Positivo:** Suero hiperinmune de conejo, elaborado contra AgESFh sin diluir; **Control Negativo:** Solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF); **Muestra Problema:** Suero hiperinmune de ratón, elaborado contra AgESFh sin diluir.

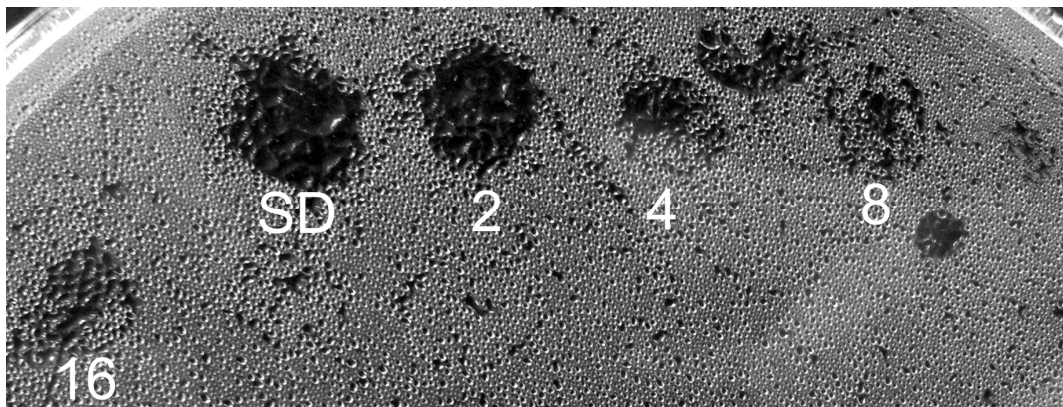


Figura 8. Titulación de anticuerpos policlonales de ratón elaborado contra antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AgESFh), mediante inmunoensayo en capa fina. Se observa similitudes en la capacidad hidrofílica (condensación) con los controles positivos, hasta la dilución del suero 1/16. **SD:** suero hiperinmune de ratón anti AgESFh, sin diluir.

4. Desarrollo del *ELISA sandwich*

4.1. Estandarización del sistema *ELISA sandwich*

Para cada concentración evaluada del anticuerpo de captura, segundo anticuerpo y conjugado se observó una separación adecuada entre el control positivo, el control negativo y el blanco de la prueba; obteniéndose valores similares entre el control negativo y el blanco de la prueba. Los valores más altos de densidades ópticas en el control positivo se obtuvieron al emplear la dilución de conjugado 1/1000 (figura 10,11 y 12). El procedimiento para la estandarización del sistema *ELISA sandwich*, se muestra en la figura 9.

Los resultados obtenidos en la estandarización del sistema *ELISA sandwich* (Figura 12) fueron los siguientes:

- **Anticuerpo de captura:** La concentración óptima fue 10 µg/mL
- **Segundo anticuerpo:** La concentración óptima fue 5 µg/mL
- **Conjugado:** La dilución óptima fue 1/1000

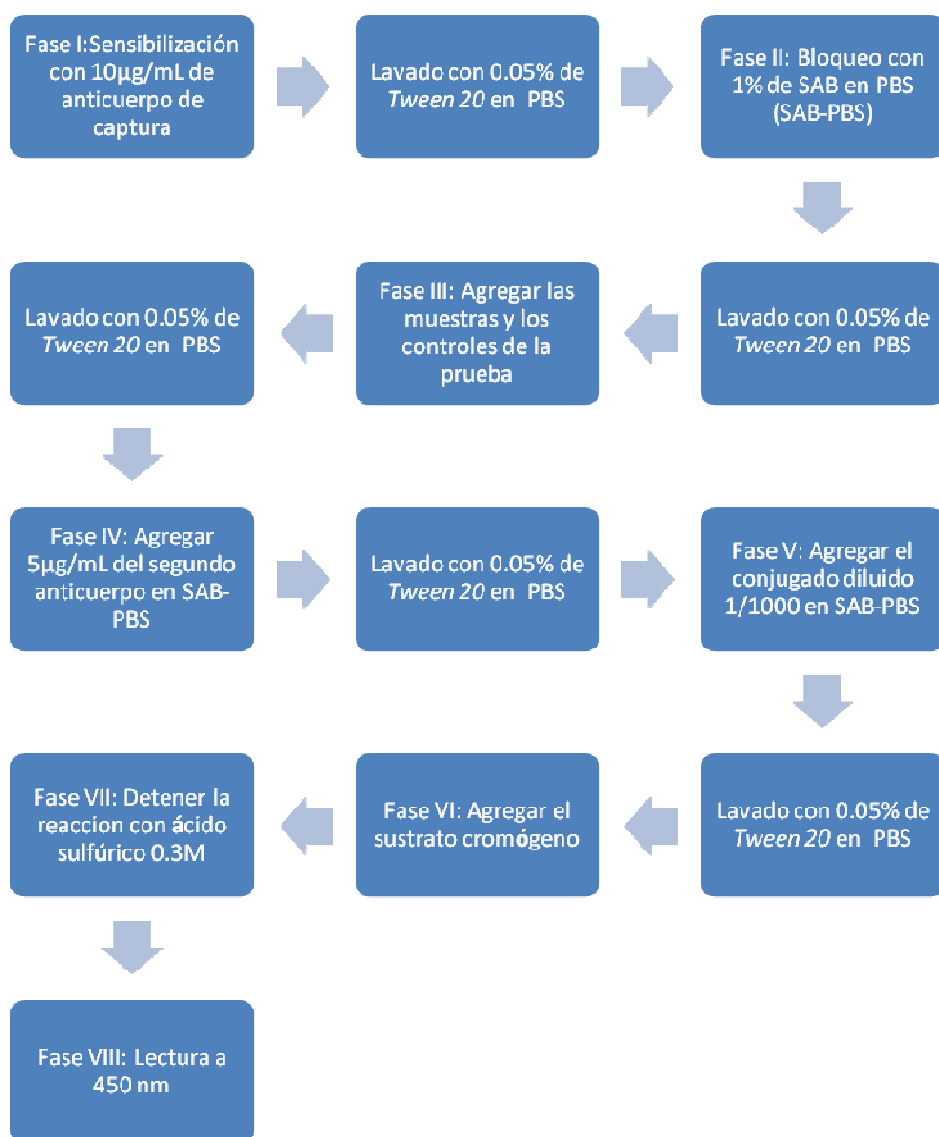


Figura 9. Diagrama de flujo del procedimiento para la estandarización del sistema *ELISA sandwich*.

La diferencia entre los valores de densidades ópticas (D.O.) para cada uno de los controles y el blanco de la prueba, empleando la concentración óptima de anticuerpo de captura, segundo anticuerpo y, la dilución óptima del conjugado, se muestran en la figura 13.

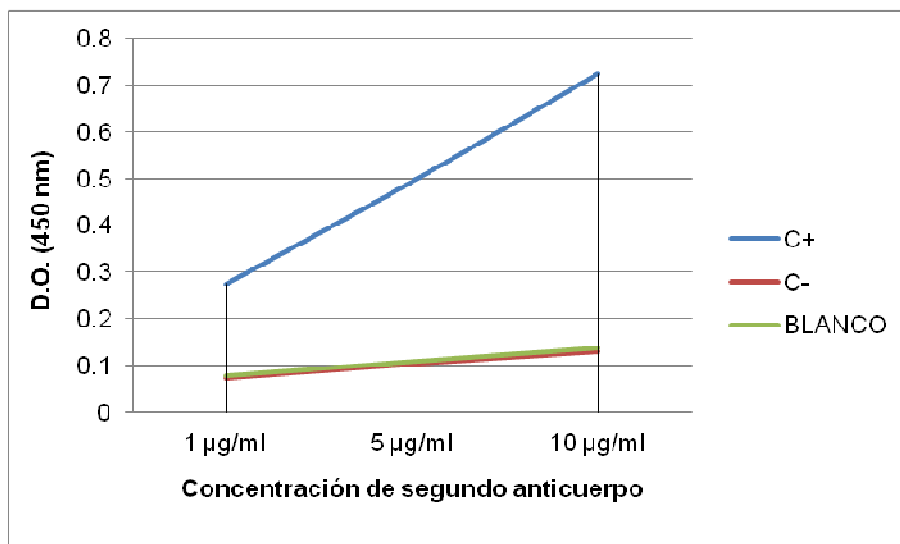


Figura 10. Estandarización del sistema *ELISA sandwich*, empleando la concentración de anticuerpo de captura de 1 µg/mL, tres concentraciones de segundo anticuerpo (1,5 y 10 µg/mL) y una dilución del conjugado de 1/1000.

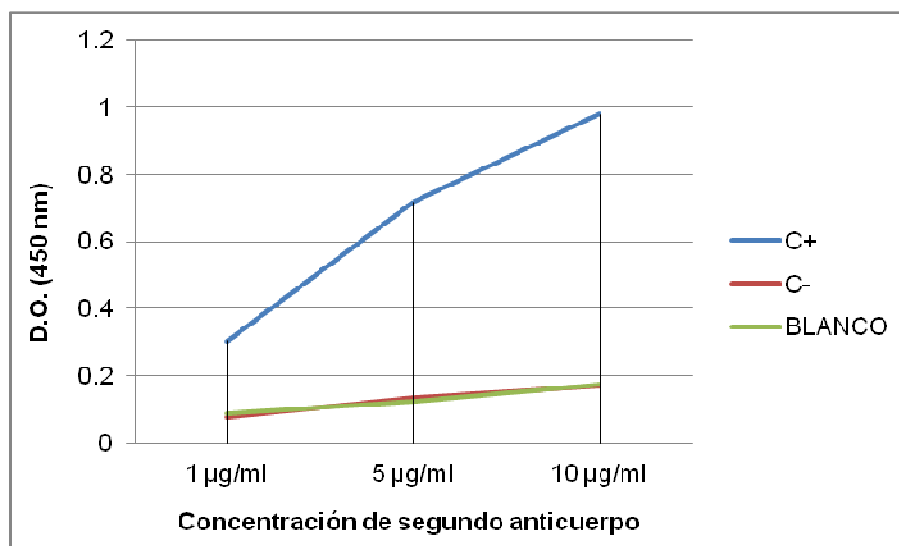


Figura 11. Estandarización del sistema *ELISA sandwich*, empleando la concentración de anticuerpo de captura de 5 µg/mL, tres concentraciones de segundo anticuerpo (1,5 y 10 µg/mL) y una dilución del conjugado de 1/1000.

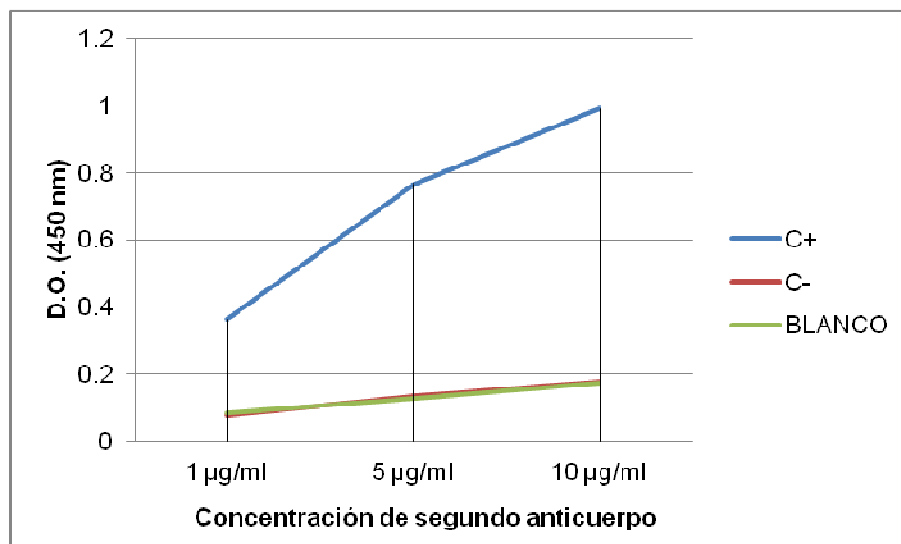


Figura 12. Estandarización del sistema *ELISA sandwich*, empleando la concentración de anticuerpo de captura de 10 µg/mL, tres concentraciones de segundo anticuerpo (1,5 y 10 µg/mL) y una dilución del conjugado de 1/1000.

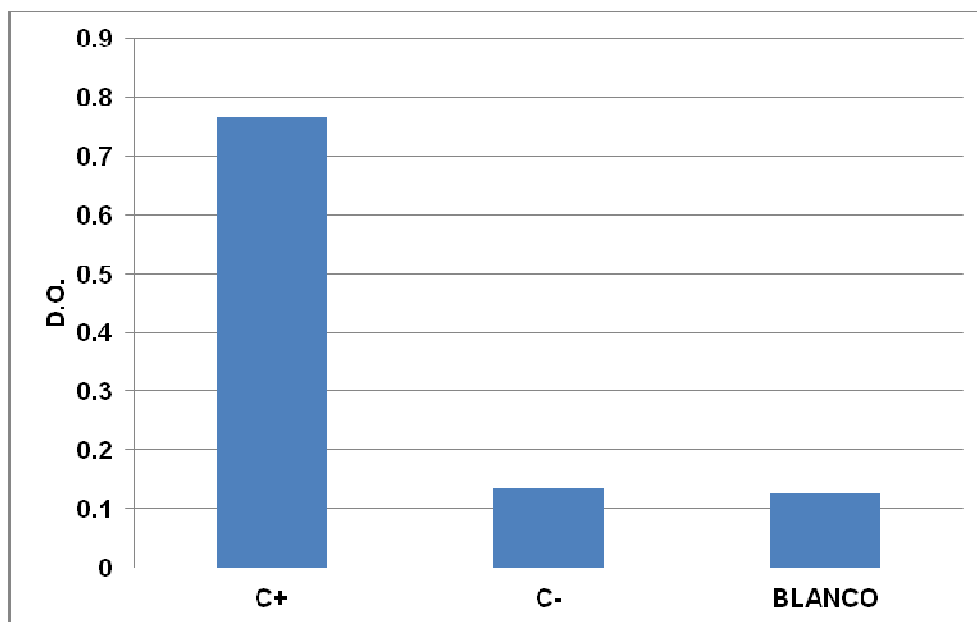


Figura 13. Valores obtenidos para cada uno de los controles (C+ y C-) y el blanco de la prueba, empleando la concentración óptima de anticuerpo de captura, segundo anticuerpo y, la dilución óptima del conjugado.

4.2. Determinación del límite de detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AgESFh) por *ELISA sandwich*

El límite de detectabilidad para los AgESFh en PBS, por *ELISA sandwich* fue de 0.1 ug/mL (100ng/mL). Respecto a los AgESFh en agua destilada, el límite de detectabilidad por *ELISA sandwich* fue de 0.78 mg/mL (780ng/mL). Los resultados se muestran en la figura 14.

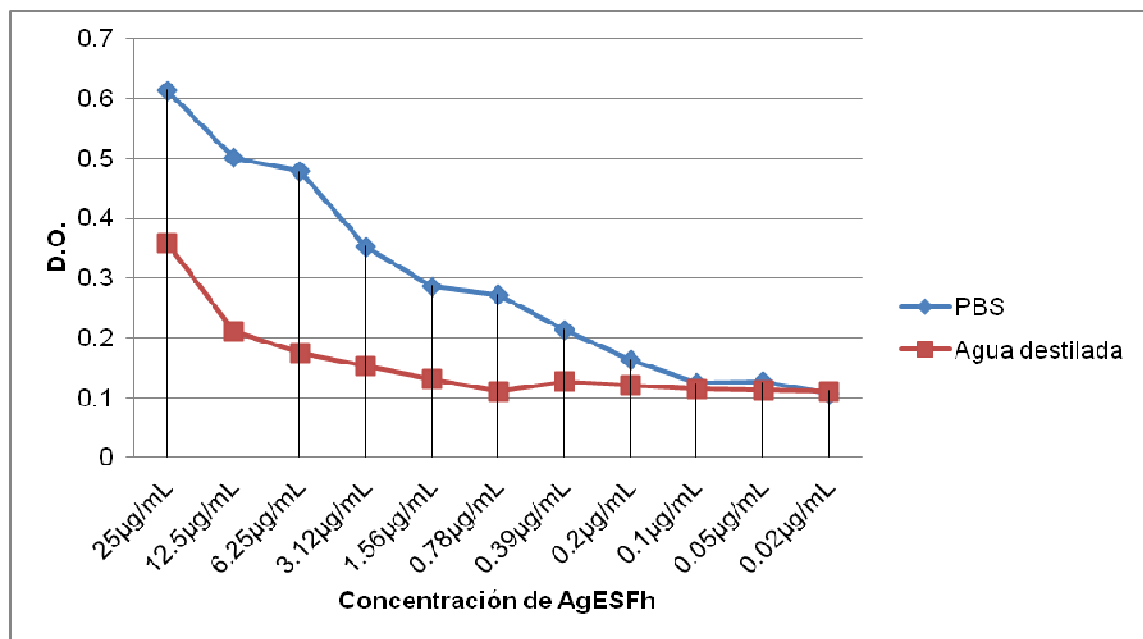


Figura 14. Determinación del límite de detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AgESFh) por *ELISA sandwich*.

4.3. Detección de coproantígenos por CIEF y *ELISA sandwich*

La comparación de resultados obtenidos para cada una de las pruebas de diagnóstico en estudio se muestran en la tabla 2. En la tabla 1, se muestran los valores de densidades ópticas (D.O.) para las muestras de heces determinadas como positivas y negativas por el método coproparasitológico directo, CIEF y *ELISA sandwich* para determinar el punto de corte (*Cut off*). Para ello se calculó el promedio de los valores negativos más dos desviaciones estándar, los valores sobre este

resultado fueron considerados positivos y bajo este valor negativos. El valor de corte fue 0.204.

Tabla 1. Valores de densidades ópticas (D.O.) de muestras de heces positivas y negativas por *ELISA sandwich*. El valor de corte se determinó a partir del promedio de las absorbancias de los valores de las muestras de heces negativas más dos desviaciones estándar. **X**: Media Muestral; **SD**: Desviación estándar.

	X (D.O.) ± SD	Número de muestras
POSITIVOS	0.317 ± 0.137	2
NEGATIVOS	0.0342 ± 0.008	29
CUT OFF [X (D.O.) + 2*SD]	0.204	12

Tabla 2. Comparación de resultados obtenidos para cada una de las pruebas de diagnóstico en estudio (COPRO: examen coproparasitológico directo; CIEF: Contrainmunolectroforesis y ELISA: *ELISA sandwich*).

Muestra	ELISA	COPRO	CIEF
1	Negativo	Negativo	Negativo
2	Positivo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo
6	Positivo	Positivo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo
26	Negativo	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo
31	Negativo	Negativo	Negativo

Para determinar las diferencias entre los valores de las densidades ópticas (D.O.) se compararon los datos obtenidos en las muestras negativas y positivas, con el valor de corte (*Cut off*) y la D.O. del control positivo de la prueba (25µg/mL de antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* en PBS) (Figura 15).

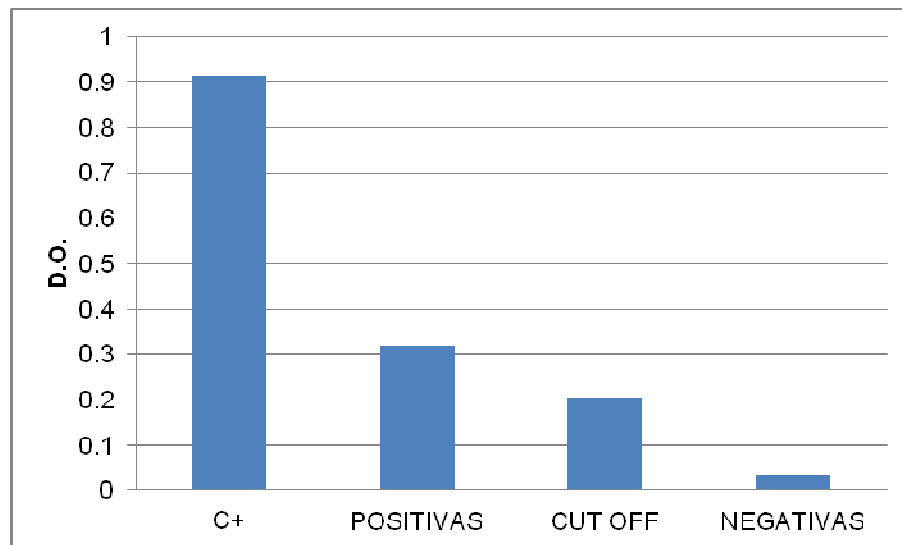


Figura 15. Comparación de los valores de densidades ópticas (D.O.) obtenidos en las muestras de heces negativas y positivas, con el valor de corte (*Cut Off*) y el control positivo de la prueba (C+).

En la tabla 3, se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo [Vp (+)] y valor predictivo negativo [(Vp (-)] de los resultados de las pruebas de contrainmunoelectroforesis (CIEF) y *ELISA sandwich*, en relación al examen coproparasitológico directo. Al comparar el *ELISA sandwich* con el examen coprológico directo, se obtuvo los siguientes resultados: sensibilidad del 100%, especificidad del 96.6%, valor predictivo positivo del 50% y valor predictivo negativo del 96.6%. En el caso de comparar la contrainmunoelectroforesis (CIEF) con el examen coproparasitológico directo, se obtuvo los siguientes resultados: sensibilidad del 0%, especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 0% y valor predictivo negativo del 96.7%. En la tabla 4, se muestra los resultados al comparar el *ELISA sandwich* con la contrainmunoelectroforesis (CIEF).

Tabla 3. Especificidad, sensibilidad y valores predictivos del *ELISA sandwich* y la Contrainmunolectroforesis (CIEF) con relación al examen coproparasitológico directo para coproantígenos de *Fasciola hepatica* en ovinos. Donde Vp (+): Valor predictivo positivo y Vp (-): Valor predictivo negativo.

	<i>ELISA sandwich</i>	CIEF
% Sensibilidad	100	0
% Especificidad	96.6	100
% Vp (+)	50	0
% Vp(-)	96.6	96.7

Tabla 4. Especificidad, sensibilidad y valores predictivos del *ELISA sandwich* con respecto a la Contrainmunolectroforesis (CIEF) para coproantígenos de *Fasciola hepatica* en ovinos.

	<i>ELISA sandwich</i>
% Sensibilidad	0
% Especificidad	93.5
% Vp (+)	0
% Vp(-)	100

VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló un *ELISA* tipo *sandwich* (*ELISA sandwich*) para la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, el cual por ser una prueba inmunológica depende de la calidad del antígeno empleado en la obtención de anticuerpos específicos. El polipéptido identificado en este estudio presentó un peso molecular de 23 kDa, lo cual según Díaz *et al.* (1998), corresponden a antígenos de excreción-secreción (antígenos metabólicos) producidos por los gránulos secretorios del tipo T1 y T2, del parásito adulto. Espino *et al.* (2000), reportaron que las fracciones antigénicas de 14, 23, y 27 kDa se identificaron con más frecuencia en las heces de pacientes con fasciolosis crónica y de animales infectados experimentalmente, en diferentes fases de la enfermedad. En el análisis electroforético realizado no se pudieron observar la totalidad de las bandas reportadas por otros investigadores, a excepción de una banda prominente de 23 kDa; esto debido a la concentración de proteínas empleada en la electroforesis *SDS-PAGE* y al sistema electroforético empleado que no permitió observar bandas menores a 15 kDa. Varios autores utilizan métodos como la precipitación por saldo, la filtración en gel o membranas, para concentrar previamente los antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* antes de realizar la electroforesis *SDS-PAGE* (Espino *et al.* 2000; Fredes *et al.*, 2003; Colmenares *et al.*, 2007)

Los protocolos de inmunización empleados en ratones Balb/c y conejos de raza Nueva Zelanda, permitieron obtener los respectivos sueros hiperinmunes que al ser evaluadas mediante pruebas serológicas de precipitación en gel, se comportaron de manera similar a lo reportado por Hillyer (1980) y Youssef & Aziz (1991), lo cual corrobora la especificidad de los sueros hiperinmunes obtenidos contra antígenos de excreción- secreción de *Fasciola hepatica*. Para la titulación del suero hiperinmune de conejo y de ratón se optó por la prueba de inmunoensayo en capa fina, obteniéndose un título de 512 y 16, respectivamente. La prueba de inmunoensayo en capa fina o

Thin Layer Immunoassay (TIA), es una prueba de unión primaria (Morilla & Bautista, 1986), la cual ha sido empleada en la detección de anticuerpos específicos en sueros de animales con fasciolosis. Los títulos obtenidos por esta prueba son superiores a los conseguidos en pruebas serológicas como la hemaglutinación indirecta pasiva y precipitación en gel; siendo sólo superada por pruebas de *ELISA* como el *DOT-ELISA*, la cual obtiene títulos 1000 veces más altos que los conseguidos por inmunoensayo en capa fina (Arriaga *et al.*, 1989). Los anticuerpos policlonales empleados en el desarrollo del *ELISA sandwich*, no se separaron por filtración en gel ni fueron purificados por cromatografía de afinidad (Rabia *et al.*, 2010), lo cual permitió trabajar con anticuerpos característicos de la respuesta inmune secundaria como los anticuerpos del isotipo IgG. Sin embargo los anticuerpos de conejo y ratón, separados por precipitación por salado, empleados en concentraciones de 1, 5 y 10 µg/mL en la estandarización del *ELISA sandwich*, obtuvieron valores altos de absorbancias en el control positivo de la prueba y no reaccionaron significativamente frente al control negativo ni al blanco de la prueba.

El *ELISA sandwich* propuesto es un sistema de dos anticuerpos, donde el primer anticuerpo de captura adherido al soporte de poliestireno, son los anticuerpos policlonales de ratón y el segundo anticuerpo que es reconocido por el conjugado son los anticuerpos policlonales de conejo; sistema denominado *ELISA sandwich* indirecto con dos anticuerpos heterólogos. La concentración óptima para el anticuerpo de captura fue de 10 µg/mL y en el caso del segundo anticuerpo fue de 5 µg/mL; respecto a la concentración del anticuerpo de captura Espino *et al.* (1998) y Estuningsih *et al.* (2009), emplearon una concentración de 5 µg/mL y 2.5 µg/mL respectivamente; siendo en ambos casos anticuerpos monoclonales de ratón. Al evaluar la concentración de 5 µg/mL del anticuerpo captura se observó claras diferencias entre el control positivo, control negativo y el blanco de la prueba, pero se eligió la concentración de 10 µg/mL como concentración óptima de anticuerpo de captura, debido a que esta obtuvo el

valor más alto de densidad óptica (D.O.) en el control positivo y valores significativamente menores de D.O., en el control negativo y el blanco de la prueba; lo cual se relaciona con los estudios antes citados, a pesar que en ellos emplearon anticuerpos monoclonales de murinos de la clase IgG, en contraste con a la utilización de anticuerpos policlonales de ratón en el desarrollo del presente *kit* de *ELISA*. Además se ha reportado la capacidad de sensibilizar los soportes de poliestireno de manera óptima con concentraciones cercanas a 10 µg/mL (Ochoa *et al.*, 2001). Respecto a los valores de concentración óptima del segundo anticuerpo y el tipo de anticuerpo a emplear son muy variables en los diferentes sistemas *ELISA sandwich*. Esta variedad es debido a que las características del segundo anticuerpo van a determinar la lectura de la prueba, las cuales se pueden agrupar en tres metodologías: anticuerpos conjugados con peroxidasa, anticuerpos conjugados con biotina y anticuerpos no conjugados, en este caso la lectura de la prueba depende de un anticuerpo monoclonal anti-anticuerpo conjugado con peroxidasa o biotina. En el presente trabajo se empleó anticuerpos policlonales de conejo como segundo anticuerpo y para realizar la lectura de la prueba se empleó una dilución óptima del anticuerpo monoclonal de ratón anti-inmunoglobulina de conejo conjugado con la enzima peroxidasa de 1/1000. Esto permitió diferenciar claramente los controles empleados en el desarrollo del *ELISA sandwich*, y del mismo modo las muestras positivas de las muestras negativas. Sánchez-Andrade *et al.* (2000), emplearon como segundo anticuerpo: anticuerpos policlonales de conejo de la clase IgG a una concentración de 0.6 µg/mL y como conjugado: anticuerpos monoclonales anti-IgG de conejo conjugados con la enzima peroxidasa a una dilución de 1/1000; lo cual logró obtener resultados sobresalientes en la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* en suero de ganado ovino.

El límite de detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AgESFh) por *ELISA sandwich*., empleando como diluyente PBS fue de 100

ng/mL mientras que para AgESFh diluidos en agua destilada (diluyente usado en el procesamiento de muestras de heces), se encontró una disminución del límite de detectabilidad hasta un valor de 780 ng/mL. Ambos límites se determinaron siguiendo el criterio en el cual los valores de absorbancia se mantenían constantes o dejaban de variar significativamente. Diversos autores han reportado que al diluir las muestras de heces en un tampón salino suplementados con *Tween 20*, SAB o azida de sodio y en algunos casos agua destilada suplementada con *Tween 20*, permiten obtener valores de absorbancia y límites de detección más altos que evaluando las muestras de heces diluidos sólo con agua destilada o muestras de suero sin diluir; además en estos trabajos se observó que una vez procesadas las muestras de heces pueden ser almacenadas a -20°C hasta su uso sin ocasionar pérdida en la capacidad antigénica de las proteínas de excreción- secreción de *Fasciola hepatica*, presentes en las muestras de heces (Espino & Finlay, 1994; Almazán *et al.*, 2001; Mezo *et al.*, 2004; Domenech *et al.*, 2009).

La evaluación del *kit ELISA* tipo *sandwich* propuesto, permitió obtener resultados preliminares que sustentan la necesidad de seguir investigando para en un futuro próximo poder aplicarlo con éxito en el campo; razón por la cual la preparación de las muestras de heces se realizó en agua destilada de manera similar a los antecedentes donde se evaluó el *kit* FASCIDIG® en el Perú (Torrel, 1997; Colona *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2002). Este procesamiento influyó en los resultados obtenidos en la prueba de contrainmunolectroforesis (CIEF), en la cual ninguna muestra problema dio positiva. Estos resultados responden a la no utilización de un *buffer* de extracción (compuesto de un tampón fosfato salino suplementado con *Tween 20* y azida de sodio), tal como lo realizaron Youssef *et al.* (1991) y Cornejo *et al.* (1994), para diluir las muestras de heces ha emplear en la CIEF. Sin embargo al ser corridos los controles positivos (antígenos de excreción-secreción diluidos en PBS), a

la par que las muestras problemas, los controles positivos precipitaron de forma óptima a lo reportado como diagnóstico positivo de la fasciolosis por CIEF.

La sensibilidad del *ELISA sandwich* propuesto fue de 100%, pero debido al reducido número de muestras positivas por *ELISA sandwich* y el examen coproparasitológico directo, este valor puede estar sobredimensionado, lo cual se evidencia en la reducción del valor predictivo positivo en un 50%. La sensibilidad del *kit* FASCIDIG®, fluctúa entre 60 y 98.7% (Torrel, 1997; Colona *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2002); en donde el valor más alto corresponde a lo reportado por Torrel (1997), el cual a diferencia de otros autores compara el *kit* FASCIDIG® con el examen de necropsia. Además reportaron una mayor cantidad de muestras positivas por necropsia comparado con el análisis coproscópico. Colona *et al.* (2001) y Castro *et al.* (2002), reportan como valores predictivos positivos 53 y 58%, respectivamente; al comparar el *kit* FASCIDIG® con el examen coproparasitológico de concentración de Dennis.

La especificidad y el valor predictivo negativo del *ELISA sandwich*, fue de 96.6%. Torrel (1997), reporta una especificidad del 100% del *kit* FASCIDIG® con relación al examen de necropsia. Colona *et al.* (2001) y Castro *et al.* (2002), reportaron una especificidad del 70%, y valores negativos de 74 y 90%, respectivamente; al comparar el FASCIDIG® con el examen coproparasitológico de concentración de Dennis.

La especificidad de la contrainmunolectroforesis (CIEF) comparada con el examen coproparasitológico directo fue de 100%, debido a que la CIEF no determinó muestras positivas; este valor de la especificidad se observa aumentado debido a la reducción del valor predictivo negativo: 96.7%. Cornejo *et al.* (1994), evaluaron las técnica de sedimentación por gravedad (método de Lumbreras) y la contrainmunolectroforesis (CIEF) para la observación de huevos y la detección de

coproantígenos del parásito, respectivamente. De las 106 muestras que evaluaron 13 fueron positivas solo por CIEF, determinando una especificidad de 87.7%; esto debido al número de muestras analizadas y el empleo del buffer de extracción en la preparación de las muestras.

Al comparar la contrainmunolectroforesis (CIEF) con el *ELISA sandwich* se obtuvo una especificidad de 93.5%, esto debido al resultado positivo de las muestras evaluadas, las cuales para la CIEF fueron falsas positivas lo que redujo la especificidad del *ELISA sandwich* (93.5%) respecto a la CIEF. El valor predictivo negativo del *ELISA sandwich* respecto a la CIEF fue de 100%, debido a que las muestras negativas para ambas coincidió con el número de muestras negativas por CIEF.

Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y positivo, reportados por Torrel, 1997; Colona *et al.*, 2001 y Castro *et al.*, 2002, constituyen los referentes más cercanos de comparación, a pesar de que dichos autores en su momento se enfrentaron con la complejidad de los factores que engloba la evaluación de un *kit* en el campo, los cuales trascienden los alcances del presente trabajo.

VII. CONCLUSIONES

1. El *kit* de *ELISA* tipo *sandwich* desarrollado permite detectar antígenos metabólicos en muestras de heces de ganado ovino.
2. Los sueros hiperinmunes de ratón y conejo contra antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, dieron un título de 16 y 512, respectivamente mediante titulación por inmunoensayo en capa fina.
3. Se determinó una concentración óptima de anticuerpo de captura (anticuerpos policlonales de ratón) y segundo anticuerpo (anticuerpos policlonales de conejo) de 10 y 5 µg/mL, respectivamente; y una dilución óptima del conjugado (anticuerpo monoclonal anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con la enzima peroxidasa) de 1/1000.
4. El límite de detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* por el *kit ELISA* tipo *sandwich* fue 100 ng/mL.
5. La sensibilidad y especificidad del *kit ELISA* tipo *sandwich* fue del 100% y 96.6% respectivamente, al compararlo con el examen coproparasitológico directo.
6. El *kit* de *ELISA* tipo *sandwich* presentó una especificidad del 93.5% con relación a la contrainmunolectroforesis.

VIII. RECOMENDACIONES

- Separación y purificación de anticuerpos policlonales de ratón de la clase IgG.
- Separación y purificación de anticuerpos policlonales de conejo de la clase IgG.
- Conjugación de anticuerpos policlonales de conejo de la clase IgG peroxidasa o biotina.
- Emplear como diluyentes de muestras de heces: PBS, PBS suplementado con *Tween 20* o agua destilada suplementada con *Tween 20*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew & PILLAI Shiv. *Inmunología celular y molecular*. 6ta ed. Madrid-España: Elsevier, 2008. 566 p. ISBN: 978-84-8086-311-7.

ABDEL-RAHMAN, Eman & ABDEL-MAGEED, Kadria. Molecular identity of major cross-reactive adult antigens in *Fasciola gigantica*, *Toxocara vitulorum* and *Moniezia expansa*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2000, vol. 30, n° 2, p. 561 –571.

ALARCÓN, B.; COLMENARES C. & NOYA O. Comunidad Antigénica y Reactividad Cruzada: su repercusión en el Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Parasitarias. Especial referencia a Esquistosomiasis. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2001, vol. 20, n° 2, p.163-171.

ALLAN J. & CRAIG P. Coproantigens in gut tapeworm infection; *Hymenolepis diminuta* in rats. *Parasitol. Research*. 1989, vol. 76, p. 68 -73.

ALMAZAN, Consuelo; AVILA, Guillermina; QUIROZ, Hector; IBARRA, Froylan & OCHOA, Pedro. Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Veterinary Parasitology*. 2001, vol. 97, p. 101–112.

ARRIAGA, Camila; PANIAGUA, Ricardo; RUIZ, Angela; BAUTISTA, Carlos & MORILLA, Antonio. Comparison of Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA), Passive Haemagglutination Test (PHT) and Thin Layer Immunoassay (TIA) in the Diagnosis of Natural or Experimental *Fasciola hepatica* Infections in Sheep. *Veterinary Parasitology*. 1989, vol. 30, p.197-203.

BECKHAM, Simone; PIEDRAFITA, David; PHILLIPS, Carolyn; SAMARAWICKREM, Nirma; LAW, Ruby; SMOOKER, Peter; QUINSEY, Noelene; IRVING, James; GREENWOOD, Deanne; VERHELST Steven; BOGYO, Matthew; TURK, Boris; COETZER, Theresa; WIJEYEWICKREMA, Lakshmi; SPITHILL, Terry & PIKE, Robert . A major cathepsin B protease from the liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. *Int J Biochem Cell Biol.* 20. 2009, vol. 41, n° 7, 1601–1612. Doi:10.1016/j.biocel.2009.02.003.

BAUTISTA, Carlos & LEBRIJA, Adriana, 2008. Los productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* disminuyen la producción de células productoras de anticuerpos contra antígenos timodependientes en ratones. *Vet. Méx.* 2008, vol. 39, n° 4, p. 429-433.

BELTRÁN, María; TANTALEÁN, Manuel; MEZA, Hugo & LOZANO, María. Fasciolosis errática. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2004, vol. 21, n° 4, p. 276-279.

BRADY, Miriam; O'NEILL, Sandra; DALTON, John & MILLS, Kingston. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *INFECT. IMMUN.* 1999, vol. 67, n° 10, p. 5372-5378.

BROWN, Wendy; DAVIS, William; DOBBELAERE, Dirk & RICE-FICHT, Allison. CD4+ T-Cell Clones Obtained from Cattle Chronically Infected with *Fasciola hepatica* and Specific for Adult Worm Antigen Express Both Unrestricted and Th2 Cytokine Profiles. *INFECT. IMMUN.* 1994, vol. 62, n° 2, p. 818-827.

CANCELA, Martin; RUÉTALO, Natalia; DELL'OCA, Nicolás; DA SILVA, Edileuza; SMIRCICH, Pablo; RINALDI, Gabriel; ROCHE, Leda; CARMONA, Carlos; ALVAREZ-VALÍN, Fernando; ZAHA, Arnaldo & TORT, José. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics.* 2010, vol. 11, n° 227, p. 1-14. Doi: 10.1186/1471-2164-11-227.

CARNEVALE, Silvana; RODRÍGUEZ, Mónica; SANTILLAN, Graciela; LABBE, Jorge; CABRERA, Marta; BELLEGARDE, Enrique; VELÁSQUEZ, Jorge; TRGOVCIC, Jorge & GUARNERA, Eduardo. Immunodiagnosis of Human Fascioliasis by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and a Micro-ELISA. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001, vol. 8, n° 1, p. 174 -177.

CASTRO, Julia; YOVERÁ, Juli & COLONA, Erasmo. Detección de coproantígenos de *Fasciola hepatica* en vacunos mediante un *sandwich-ELISA*. *Revperú Parasitol*. 2002, vol. 16, n° 1, p. 10-13

COLLINS, Peter; STACK, Colin; O'NEILL, Sandra; DOYLE, Sean; RYAN, Thecla; BRENNAN, Gerard; MOUSLEY, Angela; STEWART, Michael; MAULE, Aaron; DALTON, John & DONNELLY, Sheila. Cathepsin L1 the Major Protease Involved in Liver Fluke (*Fasciola hepatica*) Virulence. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004, vol. 279, n° 17, p. 17038-17046.

COLMENARES, Cecilia; MÉNDEZ, Liber; DÍAZ, Zoraida & ALARCÓN DE NOYA, Belkysyolé. Antígeno excreción-secreción de *Fasciola hepatica*: ultrafiltración y aplicación en inmunodiagnóstico. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2007, vol. 41, n° 2, p. 259-266.

COLONA, Erasmo; ALZAMORA, Libertad & CASTRO, Julia. Evaluación de antígenos de *Fasciola hepatica* por tres métodos inmunológicos. *Rev. per. biol*. 2001, vol. 8, n°2, p. 10-14.

CORNEJO, William; CONTRERAS, Olga; HUIZA, Alina & NAQUERA, Frida. Diagnóstico de fasciolosis humana mediante la detección de coproantígenos usando contrainmunolectroforesis. *Revista Peruana de Parasitología*. 1994, vol. 14, n° 2, p. 81-83.

CORNELISSEN, B.; GAASENBEEK, P.; BOERSMA, W.; BORGSTEEDE, H; & VAN MILLIGEN J. Use of pre-selected epitope cathepsin –L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Int. J. Parasitol.* 1999, vol. 29, p. 685 - 696.

CRUZ, Humberto; QUIROZ, Héctor; GUERRERO, Cristina; IBARRA, Froylán & OCHOA, Pedro, 1999. Cinética de excreción de huevos y títulos de anticuerpos a *Fasciola hepática*, en ganado bovino tratado con triclabendazol en clima cálido húmedo en México. *Vet. Méx.* 1999, vol. 30, n° 4, p. 273-279.

DALTON, John. *Fasciolosis*. Republic of Ireland: CABI Publishing, 1999. 527 p. ISBN: 0-85199-260-9.

DALTON, John; MCGONIGLE, Sharon; ROLPH, Timothy & ANDREWS, Stuart. Induction of Protective Immunity in Cattle against Infection with *Fasciola hepatica* by Vaccination with Cathepsin L Proteinases and with Hemoglobin. *INFECT. IMMUN.* 1996, vol. 64, n° 12, p. 5066-5074.

DÍAZ, Ailén; LI-ELÍAS, Olga; OTERO, Oscar; GARCÍA, Claribel & ESPINO, Ana. Identificación, mediante *Western Blot*, de inmunógenos de *Fasciola hepatica*, reconocidos por los sueros de ratas infectadas experimentalmente. *REV CUBANA MED TROP.* 1998, vol. 50, n° 1, p.12-17.

DÍAZ, René; GARCÉS, Madelyn; MILLÁN, Leslie; PÉREZ, Jorge & MILLÁN, Juan. Comportamiento clínico-terapéutico de *Fasciola hepatica* en una serie de 87 pacientes. *REV CUBANA MED TROP.* 2011, vol. 63, n° 3, p. 268-274.

DOMENECH, Ingrid; MARCET, Ricardo; FIGUEREDO, Mabel & SARRACENT, Jorge. Conservación de heces humanas para la detección de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. *Comunicación breve. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"*. 2009, p. 5.

DONNELLY, Sheila; O'NEILL, Sandra; SEKIYA, Mary; MULCAHY, Grace & DALTON, John. Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages. *INFECT. IMMUN.* 2005, vol. 73, n° 1, p. 166-173.

DOWLING, David; HAMILTON, Clare; DONNELLY, Sheila; LA COURSE, James; BROPHY, Peter; DALTON, John & O'NEILL, Sandra. Major Secretory Antigens of the Helminth *Fasciola hepatica* activate a Suppressive Dendritic Cell Phenotype That Attenuates Th17 Cells but Fails to Activate Th2 Immune Responses. *INFECT. IMMUN.* 2010, vol. 78, n° 2, p. 793-801.

DOY, T. & HUGHES, D. The role of the thymus in the eosinophil response of rats infected with *Fasciola hepatica*. *Clin. exp. Immunol.* 1982, vol. 47, p. 74-76.

DUFFUS, W. & FRANKS, D. *In vitro* effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clin. exp. Immunol.* 1980, vol. 41, p. 430-440.

DUMÉNIGO, Blanca & FINLAY, Carlos. Detección y cuantificación de coproantígenos de *Fasciola hepatica* en ganado ovino. *Rev Cubana Med Trop.* 1998, vol. 50, n° 1, p. 82-84.

EL-AHWANY, Eman; RABIA, Ibrahim; NAGY, Faten; ZOHEIRY, Mona; DIAB, Tarek & ZADA, Suher. Protective role of purified cysteine proteinases against *Fasciola gigantica* infection in experimental animals. *Korean J. Parasitol.* 2012, vol. 50, n° 1, p. 45-51; <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2012.50.1.45>

ESCALANTE, Hermes; DAVELOIS, Kelly; ORTIZ, Pedro; RODRÍGUEZ, Hans; DÍAZ, Enrique & JARA, Cesar. Estandarización de la técnica de *Western blot* para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepática*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2011, vol. 28, n° 3, p. 454-461.

ESPINO, Ana; BORGES, Amarilys & DUMÉNIGO, Blanca. Coproantígenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. *Rev Panam Salud Publica /Pan Am J Public Health*. 2000, vol. 7, n° 4, p. 225-231.

ESPINO, Ana; DÍAZ, Ailén; PÉREZ, Antonio & FINLAY, Carlos. Dynamics of antigenemia and coproantigens during a human *F. hepatica* outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 1998, vol. 36, n° 9, p. 2723–2726.

ESPINO, Ana; MARCET, R. & FINLAY, Carlos. Detection of circulating antigen in human fascioliasis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1990, vol. 28, n° 12, p. 2637-2640.

ESPINO, Ana; MORALES, Adelaida; DELGADO, Bonnibel; RIVERA, Francheska; FIGUEROA, Olgary & SUÁREZ, Erick. Partial Immunity to *Fasciola hepatica* in Mice after Vaccination with FhSAP2 Delivered as Recombinant Protein or DNA Construct. *Ethn Dis.* 2010, vol. 20, n° 1, p. 17-23.

ESPINO, Ana; TORRES, Daricel; MORALES, Adelaida; DELGADO, Bonnibel; QUETEL, Julia & OSUNA, Antonio. *Fasciola hepatica*: Identification of CD4+ T-Helper Epítopes from the 11.5kDa Saposin-like Protein SAP-2 Using Synthetic Peptides. *Exp Parasitol.* 2007, vol. 117, n° 1, p. 65–73.

ESPINO, Ana & FINLAY, Carlos. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory-secretory antigens in human fascioliasis. *J Clin Microbiol.* 1994, vol. 32, n° 1, p. 190-193.

ESPINOZA, José; TERASHIMA, Angélica; HERRERA-VELIT, Patricia & MARCOS, Luis. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en las economías de las zonas endémicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2010, vol. 27, n° 4, p. 604-612.

ESTUNINGSIH, Endah; SPITHILL, Terry; RAADSMA, Herman; LAW, Ruby; ADIWINATA, G.; MEEUSEN, Els & PIEDRAFITA, David. Development and application of a fecal antigen diagnostic sandwich ELISA for estimating prevalence of *Fasciola gigantica* in cattle in central Java, Indonesia. *Journal of Parasitology*. 2009, vol. 95, n° 2, p. 450-455.

FIGUEROA-SANTIAGO, Olgary; DELGADO, Bonnibel & ESPINO, Ana. *Fasciola hepatica* saposin-like-2 protein based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. *DiagnMicrobiolInfectDis*. 2011, vol. 70, n°3, p. 355–361.
Doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.016

FLYNN, Robín & MULCAHY, Grace. Possible role for toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *INFECT. IMMUN*. 2008, vol. 76, n° 2, p. 678–684.

FREDES, Fernando; ALARCÓN, Juan; ILABACA, Paula & ALCAÍNO, Héctor. Evaluación diagnóstica de dos proteínas purificadas de *Fasciola hepatica* mediante ELISA en la fasciolosis ovina. *Parasitol Latinoam*. 2003, vol. 58, p. 148 – 151.

FREDES, Fernando; GORMAN, T.; SILVA, M. & ALCALINO, Héctor. Evaluación diagnóstica de fracciones cromatográficas de *Fasciola hepatica* mediante Western Blot y ELISA en animales infectados. *Arch. med. vet*. 1997, vol. 29, n° 2, p. 283-294.
Doi: 10.4067/S0301-732X1997000200014

GONENC, Bahadır; SARIMEHMETOĞLU, Hifsi; KARA, Murat & KIRCALI, Feride. Comparison of crude and excretory/secretory antigens for the diagnosis of *Fasciola hepatica* in sheep by western blotting. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*. 2004, vol. 28, p. 943-949.

GORMAN, Texia; LÓPEZ, Claudia; FREDES, Fernando & ALCAINO, Héctor.

Monitoreo inmunológico del éxito terapéutico en fasciolosis ovina empleando un antígeno semipurificado de < 30 kDa. *Parasitol día*. 2000, vol. 24, n° 1-2. Doi: 10.4067/S0716-07202000000100004.

HAMILTON, Clare; DOWLING, David; LOSCHER, Christine; MORPHEW, Russell;

BROPHY, Peter & O'NEILL, Sandra. The *Fasciola hepatica* Tegumental Antigen Suppresses Dendritic Cell Maturation and Function. *INFECT. IMMUN.* 2009, vol. 77, n° 6, p. 2488–2498.

HILLYER, George. Isolation of *Fasciola hepatica* tegument antigens. *J. CLIN.*

MICROBIOL. 1980, vol. 12, n° 5, p. 695-699.

HURTADO, Cecilio; HUIZA, Alina & TANTALEÁN, Manuel. Determinación del

huésped intermediario de *Fasciola hepatica* en la irrigación de Asillo, Azangaro, Puno.

Rev. Per. Med. Trop. U.N.M.S.M. 1994, vol. 8, n° 2, p. 93-94.

KAGAN, Irving. Caracterización de antígenos parasitarios. Trabajo presentado en la

Sesión Especial celebrada durante la Sexta Reunión del Comité Asesor de la OPS

sobre Investigaciones Médicas de 1967 y publicado en español en el Boletín de la

Oficina Sanitaria Panamericana (1969), basado en el texto original: *Immunological*

Aspects of Parasitic Infections, Publicación Científica de la OPS. 1967 vol. 150, p. 25-

36.

KIM, Kwangsig; YANG, Hyun & CHUNG Young-Bae. Usefulness of 8 kDa protein of

Fasciola hepatica in diagnosis of fascioliasis. *The Korean Journal of Parasitology.*

2003, vol. 41, n° 2, p. 121-123.

LARREA, Hermani; FLÓREZ, Martha; VIVAR, Ronald; HUAMÁN, Pedro &

VELÁSQUEZ, Jorge. Hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en el Perú.

Revista Horizonte Médico. 2007, vol. 7, n° 1, p. 39-46.

LAW, Ruby; SMOOKER, Peter; IRVING, James; PIEDRAFITA, David; PONTING, Rebecca; KENNEDY, Nicholas; WHISSTOCK, James; PIKE, Robert & SPITHILL, Terry. Cloning and Expression of the Major Secreted Cathepsin B-Like Protein from Juvenile *Fasciola hepatica* and Analysis of Immunogenicity following Liver Fluke Infection. *INFECT. IMMUN.* 2003, vol. 71, n° 12, p. 6921–6932.

LI, Olga; LEGUÍA , Guillermo; ESPINO Ana; DUMÉNIGO, Blanca; DÍAZ, Ailén & OTERO, Oscar. Detección de anticuerpos y antígenos para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en alpacas naturalmente infectadas. *Rev Inv Vet Perú.* 2005, vol. 16, n° 2, p. 143-153.

MACO, Vicente; MARCOS, Luis; TERASHIMA, Angelica; SAMALVIDES, Frine; MIRANDA, Elba; ESPINOZA, José & GOTUZZO, Eduardo. *Fas2-ELISA* y la técnica de sedimentación rápida modificada por Lumbreras en el diagnóstico de la infección por *Fasciola hepatica*. *Rev Med Hered.* 2002, vol. 13, n° 2, p. 49-57.

MALEEWONG ,Wanchai; WONGKHAN, Chaisiri; INTAPAN, Pewpan & PIPITGOOL, Vichit. *Fasciola gigantica* specific antigens: purification by a continuous-elusion method and its evaluation for the diagnosis of human Fascioliasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, vol. 61, p. 648 - 651.

MAMANI, Willy & CONDORI, René. Determinación de resistencia antihelmíntica (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a albendazol y triclabendazol, La Paz – Bolivia. *Rev Inv Vet Perú.* 2009, vol. 20, n° 2, p. 254-262.

MARCILLA, A.; DE LA RUBIA, J.; SOTILLO, J.; BERNAL, D.; CARMONA, C.; VILLAVICENCIO, Z.; ACOSTA, D.; TORT, J.; BORNAY, F.; ESTEBAN, J. & TOLEDO, R. Leucine Aminopeptidase Is an Immunodominant Antigen of *Fasciola hepatica* Excretory and Secretory Products in Human Infections. *CLIN. VACCINE IMMUNOL.* 2008, vol. 15, n° 1, p. 95–100.

MARCOS, Luis; MACO, Vicente; TERASHIMA, Angelica; SAMALVIDES, Frine; MIRANDA, Elba; TANTALEAN, Manuel; ESPINOZA José & , GOTUZZO, Eduardo.

Hiperendemicidad de fasciolosis humana en el Valle del Mantaro, Perú: factores de riesgo de la infección por *Fasciola hepatica*. *Rev Gastroenterol Peru*. 2004, vol. 24, n° 2, p. 158-164.

MARCOS, Luis; TERASHIMA, Angelica; LEGUIA, G.; CANALES, M.; ESPINOZA, José & GOTUZZO, Eduardo. La Infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una Enfermedad Emergente. *Rev Gastroenterol Perú*. 2007, vol. 27, p. 389-396.

MARTÍNEZ, Raydel; DOMENECH, Ingrid; MILLÁN, Juan & PINO, Adonis. Fascioliasis, revisión clínico-epidemiológica y diagnóstico. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2012, vol. 50, n° 1, p. 1-7.

MARTÍNEZ, Victoria; MUIÑO, Laura; PERTEGUER, María; GARATE, Teresa; MEZO, Mercedes; GONZÁLEZ, Marta; MURO, Antonio; CORREIA DA COSTA, José; ROMARIS, Fernanda; UBEIRA, Florencio. Development and Evaluation of a New Lateral Flow Immunoassay for Serodiagnosis of Human Fasciolosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011, vol. 5, n° 11, p. 1-7. e1376. Doi:10.1371/journal.pntd.0001376.

MAS-COMA, M.; ESTEBAN, J. & BARGUES, M. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull World Health Organ*. 1999, vol. 77, n° 4, p. 340-346.

MAS-COMA, S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol*. 2005, vol. 79, n° 3, p. 207-216.

MCMANUS D. & DALTON J. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology*. 2006, vol. 133, p. S43–S61. Doi: 10.1017/S0031182006001806

MESHGI, B.; ESLAMI, A. & HEMMATZADEH F. Determination of somatic and excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using SDS-PAGE. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2008, vol. 9, n° 1, p. 77-80.

MEZO, Mercedes; GONZÁLEZ Marta; CARRO, Carmen & UBEIRA, Florencio 2004. An ultrasensitive capture *ELISA* for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *J. Parasitol.* 2004, vol. 90, n° 4, p. 845-852.

MILLER, Catherine; SMITH, Nicholas; IKIN, Rowan; BOULTER, Nicola; DALTON, John & DONNELLY, Sheila. Immunological Interactions between 2 Common Pathogens, Th1-Inducing Protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-Inducing Helminth *Fasciola hepatica*. *PLoS ONE*. 2009, vol. 4, n° 5, p. 1-10, e5692. Doi:10.1371/journal.pone.0005692.

MOREAU, Emmanuelle & CHAUVIN, Alain. Immunity against Helminths: Interactions with the Host and the Intercurrent Infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010, vol. 2010, n° 428593, p. 1-9. Doi:10.1155/2010/428593.

MORILLA, A. & BAUTISTA, C. *Manual de Inmunología*. Ed. DIANA (México). 1986. ISBN: 968-13-1578-2.

MORPHEW, Russell; WRIGHT, Hazel; LACOURSE, James; WOODS, Debra & BROPHY, Peter. Comparative Proteomics of Excretory- Secretory Proteins Released by the Liver Fluke *Fasciola hepatica* in Sheep Host Bile and during *in Vitro* Culture ex Host. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007, vol. 6, n° 6, p. 963-972. Doi: 10.1074/mcp.M600375-MCP200.

MORPHEW, Russell; WRIGHT, Hazel; LACOURSE, James; WOODS, Debra & BROPHY, Peter. Towards Delineating Functions within the Fasciola Secreted Cathepsin L Protease Family by Integrating *In Vivo* Based Sub-Proteomics and Phylogenetics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011, vol. 5, n° 1, p. 1-16, e937. Doi:10.1371/journal.pntd.0000937.

NAQUIRA, Cesar. Las zoonosis parasitarias: problema de salud pública en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010, vol. 27, n° 4, p. 494-497.

NARANJO, Feliciano. Fasciola hepatica: Avances en el empleo de candidatos vacunales. *REDVET*. 2008, vol. 9, n° 4, p. 1-11.

NOURELDIN, M.; EL-GANAINI, G.; ABOU EL-ENIN, A.; EL-NEMR, H.; HUSSIN, E. & SULTAN, D. Evaluation of seven assays detecting serum immunoglobulin classes and subclasses and salivary and faecal secretory IgG against *Fasciola* excretory/secretory (ES) antigen in diagnosing Fascioliasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol*. 2004, vol. 34, p. 691-704

OCHOA R., MARTÍNEZ J., FERRIOL X., MARGARITA A., ESTRADA E., BLANCO R., LICEA T. & SOTOLONGO F.. Sensibilización de placas para ensayos inmunoenzimáticos con antígenos vacunales. *VacciMonitor*. 2001, vol. 10, n° 4, p. 14-17.

O'NEILL S., BRADY M., CALLANAN J., MULCAHY G., JOYCE P., MILLS K. & DALTON J., 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology*. 2000, vol. 22, p. 147–155.

O'NEILL, Sandra; PARKINSON, Michael; DOWD, Andrew; STRAUSS, Wilma; ANGLES, Rene & DALTON, John. Short report: immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1999, vol. 60, n° 5, p. 749–751.

O'NEILL, Sandra; PARKINSON, Michael; STRAUSS, Wilma; ANGLES, Rene & DALTON, John. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (Fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998, vol. 58, p.417–423.

ORDÓÑEZ, Diego. “Fasciolosis crónica avanzada: análisis del desarrollo del parásito adulto y de la oviposición en el modelo experimental Wistar”. VALERO, María & MAS-COMA, Santiago. Tesis doctoral; Universidad de Valencia. España, 2010. 264p. ISBN: 978-84-370-7792-5.

ORTIZ, Pedro. Estado actual de la infección por *Fasciola hepatica* en Cajamarca, Perú. *Biomédica*. 2011, vol. 31, n° 3, p. 172-173.

PIEDRAFITA, D.; PARSONS, J.; SANDEMAN, R.; WOOD, P.; ESTUNINGSIH, S.; PARTOUTOMO, S. & SPITHILL, T., 2001. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica in vitro* is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunology*. 2001, vol. 23, p. 473-482.

PIEDRAFITA, David; RAADSMA, Herman; PROWSE, Rhoda & SPITHILL, Terry. Immunology of the host-parasite relationship in fasciolosis (*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*). *Canadian Journal of Zoology*. 2004, vol. 82, n° 2, p. 233-250.

PIEDRAFITA, David; ESTUNINGSIH, Endah; PLEASANCE, Jill; PROWSE, Rhoda; RAADSMA, Herman; MEEUSEN, Els & SPITHILL, Terry. Peritoneal Lavage Cells of Indonesian Thin-Tail Sheep Mediate Antibody-Dependent Superoxide Radical Cytotoxicity *in vitro* against Newly Excysted Juvenile *Fasciola gigantica* but Not Juvenile *Fasciola hepatica*. *INFECT. IMMUN.* 2007, vol. 75, n° 4, p.1954–1963.

RABIA, Ibrahim; SABRY, Hoda & NAGY, Faten. Comparison between Different Immunological Techniques for Detection of Circulating Fasciola Antigen in sheep. *New York Science Journal*. 2010, vol. 3, n° 7, p. 34-39.

REVILLA B., MANGA M., MIÑAMBRES, B. & GONZÁLEZ C. Análisis proteómico preliminar de antígenos de excreción-secreción y tegumento de adultos de *Dicrocoelium dendriticum*. *Veterinary Parasitology*. 2005, vol. 134, p. 229-240. Doi:10.1016/j.vetpar.2005.07.018.

RINALDI, Gabriel; MORALES, María; CANCELA, Martín; CASTILLO, Estela; BRINDLEY, Paul & TORT, José. Development of Functional Genomic Tools in Trematodes: RNA Interference and Luciferase Reporter Gene Activity in *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008, vol. 2, n° 7, p. 1-10. Doi:10.1371/journal.pntd.0000260.

RIVERA, Marco; RODRÍGUEZ, Claudia; ROJAS, Yessica; VALDIVIA, Yamali & SAUCEDO, Tabita. Conocimientos, actitudes y prácticas sobre Fascioliasis en madres de una zona rural andina del norte peruano. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010, vol. 27, n° 1, p. 59-62.

ROBINSON, Mark; MENON, Ranjeeta; DONNELLY, Sheila; DALTON, John & RANGANATHAN, Shoba. An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2009, vol. 8, n° 8, p. 1891-1907. DOI: 10.1074/mcp.M900045-MCP200.

ROBINSON Mark, CORVO Ileana, JONES Peter, GEORGE Anthony, PADULA Matthew, TO Joyce, CANCELA Martin , RINALDI Gabriel , TORT José, ROCHE Leda & DALTON John. Collagenolytic Activities of the Major Secreted Cathepsin L Peptidases Involved in the Virulence of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011, vol. 5, n° 4, p. 1-13. Doi:10.1371/journal.pntd.0001012.

ROKNI, M.; BAGHERNEJAD, A.; MOHEBALI, M. & KIA, E. Enzyme linked immunotransfer blot analysis of somatic and excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* in diagnosis of human Fascioliasis. *Iranian J. Pub. Health*. 2004, vol. 33, n° 2, p. 8-13.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J. ; PANADERO, R.; DIEZ-BAÑOS, P. & MORRONGO, P. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*. 2000, vol. 9, p. 39–46.

SÁNCHEZ, Fernando. “Caracterización, purificación y localización Inmunohistoquímica de los antígenos mayoritario de *Echinococcus granulosus* antígeno 5 y antígeno b”. MUÑOZ, Carmen. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España, 1992.

SIEMIENIUK, Ewa; KOLODZIEJCZYK, Lidia & SKRZYDLEWSKA, Elzbieta. Oxidative Modifications of Rat Liver Cell Components during *Fasciola hepatica* Infection. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2008, vol.18, p. 519–524. DOI: 10.1080/15376510701624001.

SILVA, Marcos; GORMAN, Texia & ALCAÍNO, Héctor. Inmunodiagnóstico de fasciolosis humana y ovina empleando una fracción de 24-29 kDa de *Fasciola hepatica* obtenida mediante inmunoabsorción. *Parasitol Latinoam*. 2005, vol. 60, p. 38 – 42.

SOLÍS, Carlos; VÁZQUEZ, José & LACLETTE, Juan. Hacia el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina basada en la paramiosina de *Taenia solium*. *Gac. Méd. Méx*. 2004, vol. 140, n° 2, p. 23-25.

TANTALEÁN, Manuel; ARROJO, Lily & MIRANDA, Elba. LYMNAEA COLUMELLA SAY (=PSEUDOSUCCINAEA COLUMELLA) como huésped intermediario de *Fasciola hepatica* en el Perú. *Revista Peruana de Parasitología*. 2000, vol. 15, p. 33-35.

TICONA, Daniel; CHÁVEZ, Amanda; CASAS, Gina; CHAVERA, Alfonso & LI, Olga. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos y ovinos de Vilcashuamán, Ayacucho. *Rev. investig. vet. Perú*. 2010, vol. 21, n° 2, p. 168-174.

TORREL, Teófilo. Detección de coproantígenos de *Fasciola hepatica* en ovinos y bovinos mediante un método de *ELISA*. *Rev Inv Pec IVITA (Perú)*. 1997, vol. 8, n° 1, p. 74-78.

TORRICO, Dunia. “Determinación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) por inmunofluorescencia indirecta (IFI)”. Gómez, Patricia & Calla, Jacqueline. Tesis para optar el grado de Especialista en Diagnóstico en Salud, mención Hematología. Universidad Mayor de San Andrés- Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. La Paz-Bolivia, 2000.

TRAVASSOS, L.; TEIXEIRA DE FREITAS, J. & KOHN, A. *Trematodeos do Brasil*. Tomo 64. Fascículo único. Río de Janeiro- Brasil: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1969. 886 p.

VALENCIA, Nicasio; PARIONA, Andrea; HUAMÁN, Margarita; MIRANDA, Fidel; QUINTANILLA, Serapio & GONZÁLES, Ana. Seroprevalencia de fasciolosis en escolares y en ganado vacuno en la provincia de Huancavelica, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2005, vol. 22, n° 2, p. 96-102.

VARA, M.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ, A. & ROJO, F. *Prevalencia de la fasciolosis ovina y estudios de resistencias a fasciolicidas en la provincia de León*. Veinte años de Buiatría: Actas del XIV Congreso Internacional de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes, Lugo-Santiago de Compostela. 2006, p. 523-529. ISBN 84-9750-780-0.

VARGAS, Danilo; VEGA, Marcia & GONZÁLEZ, Carmen. Aproximación a una caracterización molecular de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDs - PCR. *Parasitol Latinoam.* 2003, vol. 58, p. 11 - 16.

VÁZQUEZ, Severo. “Caracterización de la Estructura Genética Poblacional de *Fasciola hepatica* Mediante Marcadores Alozimicos y Microsatélites”. PANIAGUA, Esperanza & VILAS, Román. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela Facultad de Farmacia - Departamento de Microbiología y Parasitología. Santiago de Compostela- España, 2012.

VILLA, A.; QUIROZ, H.; CORREA, D.; IBARRA, F.; REYES, M.; REYES, H.; LÓPEZ, G.; GAZARIAN, K.; GAZARIAN, T. & ALONSO, R. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology.* 2008, vol.135, p. 1437–1445. Doi: 10.1017/S003118200800471X.

WIJFFELS, G.; SALVATORE, L.; DOSEN, M.; WADDINGTON, J.; WILSON, L.; THOMPSON, C.; CAMPBELL, N.; SEXTON, J.; WICKER, J.; BOWEN, F.; FRIEDEL, T. & SPITHILL, T. Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Experimental Parasitology.* 1994, vol. 78, p. 132–148.

WILSON, Lachlan; GOOD, Robert; PANACCIO, Michael; WIJFFELS, Gene; SANDEMAN, Mark & SPITHILL, Terry. *Fasciola hepatica*: Characterization and Cloning of the Major Cathepsin B Protease Secreted by Newly Excysted Juvenile Liver Fluke. *Experimental Parasitology*. 1998, vol. 88, p. 85–94.

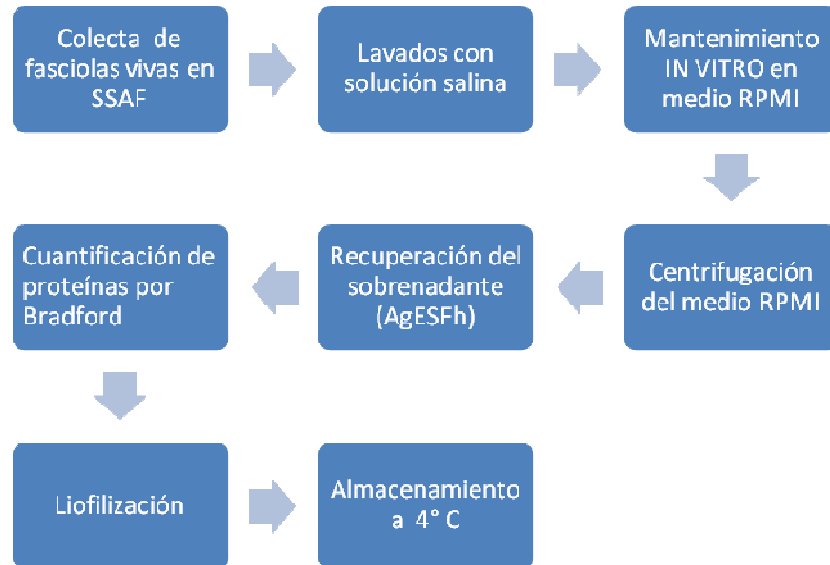
XU Min-Jun, AI Lin, FU Jing-Hua, NISBET Alasdair, LIU Qing-You, CHEN Mu-Xin , ZHOU Dong-Hui & ZHU Xing-Quan. Comparative Characterization of MicroRNAs from the Liver Flukes *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. *PLoS ONE*. 2012, vol. 7, n°12, p. 1-6. Doi:10.1371/journal.pone.0053387. e53387

YOUSSEF, F.; MANSOUR, M. & AZIZ, A. Early diagnosis of human fascioliasis by the detection of copro-antigens using counterimmunoelectrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991, vol. 85, p. 383-384.

ZHAO, Qingjie; VARGAS, Mireille; DONG, Yuxiang; ZHOU, Lin; WANG, Xiaofang; SRIRAGHAVAN, Kamaraj; KEISER, Jennifer & VANNERSTROM, Jonathan. The Structure-Activity Relationship of an Ozonide Carboxylic Acid (OZ78) Against *Fasciola hepatica*. *J Med Chem*. 2010, vol. 53, n° 10, p. 4223–4233. Doi: 10.1021/jm100226t.

ANEXOS

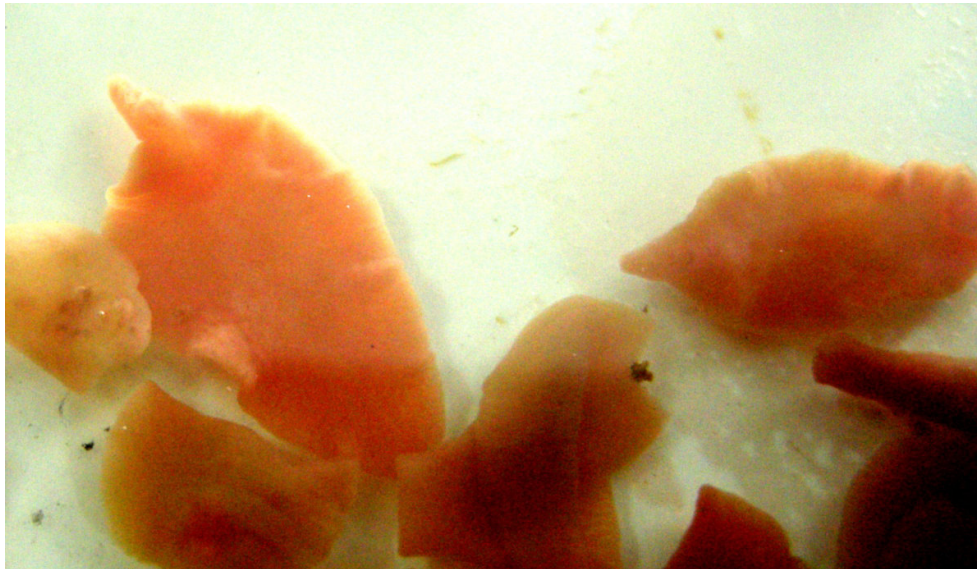
Anexo 1. Resumen del procedimiento empleado en la preparación de antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AgESFh).



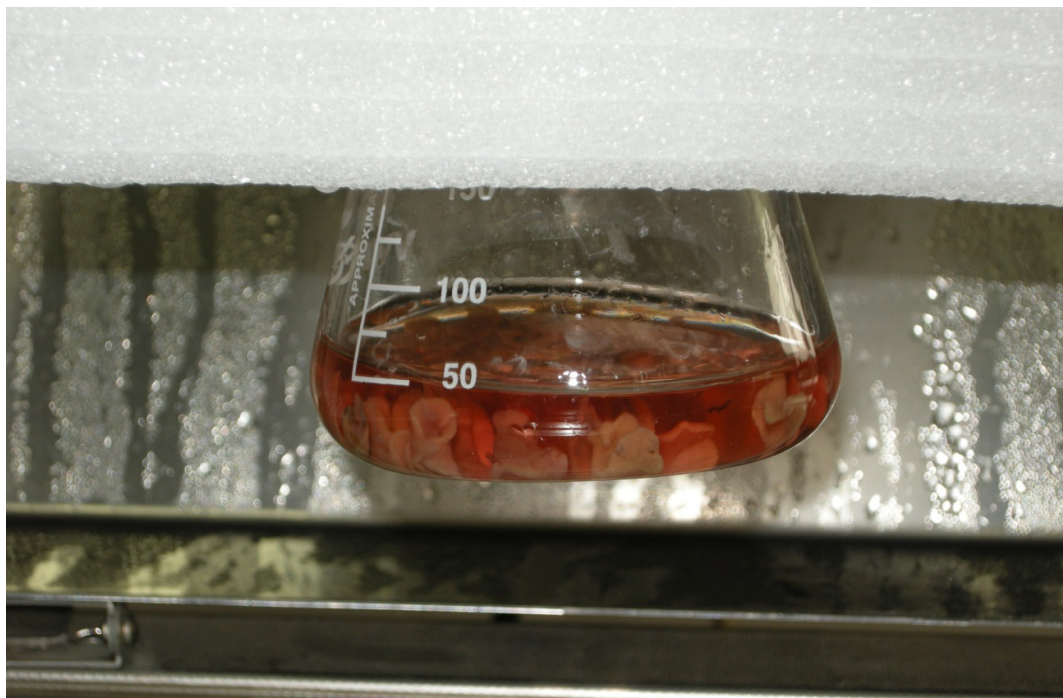
Anexo 2. Fasciolas vivas en el hígado de un bovino infectado, las cuales fueron colectadas en SSAF.



Anexo 3. Fasciolas vivas durante el proceso de lavado con solución salina.



Anexo 4. Fasciolas vivas en medio RPMI, al inicio del mantenimiento *in vitro*.



Anexo 5: Formulas empleadas en la obtención de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

$$\textbf{Sensibilidad} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100\%$$

$$\textbf{Especificidad} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100\%$$

$$\textbf{Valor predictivo negativo} = \frac{NS}{TN} \times 100\%$$

$$\textbf{Valor predictivo positivo} = \frac{PS}{TP} \times 100\%$$

Donde:

TP: Valores verdaderos positivos

TN: Valores verdaderos negativos

FP: Valores falsos positivos

FN: Valores falsos negativos

NS. Valores negativos para la prueba serológica en estudio

PS: Valores positivos para la prueba serológica en estudio

Anexo 6. Comparación del *ELISA* tipo *sandwich* propuesto, con los resultados reportados de la evaluación del *kit* FASCIDIG® en el Perú.

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Prueba de Contraste
<i>ELISA tipo sandwich</i>	100	96.6	Coproparasitológico
Torrel, 1997	98.7	100	Necropsia
Colona <i>et al.</i>, 2001	60	68.2	Coproparasitológico
Castro <i>et al.</i>, 2002	87.6	71.4	Coproparasitológico
Li <i>et al.</i>, 2005	100	100	Coproparasitológico